(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2007年10月11日(11.10.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/114296 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/02 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/056962

(22) 国際出願日: 2007年3月29日(29.03.2007)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2006-095936 2006年3月30日(30.03.2006) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人広島大学 (HIROSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7398511 広島県東広島市鏡山1丁目3番2号 Hiroshima (JP). 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 櫨木 修 (HAZEKI, Osamu) [JP/JP]; 〒7348551 広島県広島市南区霞1丁目2番3号 広島大学大学院医歯薬学総合研究科内 Hiroshima (JP). 櫨木 薫 (HAZEKI, Kaoru) [JP/JP]; 〒7348551 広島県広島市南区霞1丁目2番3号 広島大学大学院医歯薬学総合研究科内 Hiroshima (JP). 伊井 雅幸 (II, Masayuki) [JP/US]; 60015 イリノイ州、ディアフィールド、タケダパークウエイ1番地、タケダグローバルリサーチアンドデヴェロップメントセンターインコーポレイティッド内 Illinois (US). 松永 直子 (MATSUNAGA, Naoko) [JP/JP]; 〒5328686 大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目17番85号 武田薬品工業株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 高島 — (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) **Title:** SCREENING METHOD

(54) 発明の名称: スクリーニング方法

(57) **Abstract:** Disclosed is a method for screening of a prophylactic/therapeutic agent for at least one disease selected from the group consisting of a heart disease, an autoimmune disease, an inflammatory disease, a central nervous system disease, an infectious disease, sepsis, severe sepsis and septic shock. The method is characterized by selecting a substance capable of binding to an intercellular part of TLR4 and inhibiting the signaling from that molecule. Also disclosed is a kit for the method, which can detect a signal from TLR4 by utilizing the expression of a reporter gene as an indicator. The kit comprises: (1) a cell capable of expressing wild-type TLR4; and (2) a cell capable of expressing a TLR4 mutant.

(57) 要約: 本発明は、TLR4の細胞内領域に結合し、該分子からのシグナル伝達を阻害する物質を選択することを特徴とする、心疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、中枢神経系疾患、感染性疾患、セプシス、重症セプシスおよびセプティックショックからなる群より選択される1以上の疾患の予防・治療薬のスクリーニング方法、並びにTLR4からのシグナルをレポーター遺伝子の発現を指標として検出し得る、(1)野生型TLR4を発現する細胞および(2)変異型TLR4を発現する細胞を含んでなる、該方法のためのキット。

WO 2007/114296 A1

明 細 書

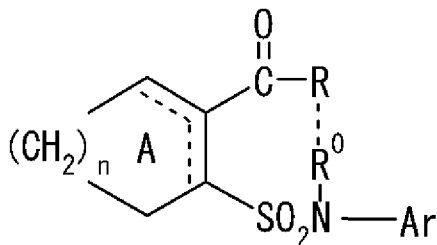
スクリーニング方法

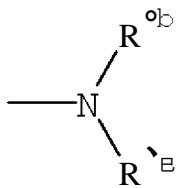
技術分野

[0001]　本発明は、心疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、中枢神経系疾患、感染性疾患、セプシス、重症セプシスまたはセプティックショックの予防・治療薬をスクリーニングする方法に関する。

背景技術

[0002]　特許文献1には、㈲式:

[0003] [化1]

[0004] [式中、Rは置換基を有していてもよい脂肪族炭化水素基、置換基を有していてもよい芳香族炭化水素基、置換基を有していてもよい複素環基、式:$-OR^1$(式中、R^1は水素原子または置換基を有していてもよい脂肪族炭化水素基を示す。)で表される基または式:

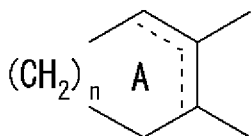
[0005] [化2]

[0006] (式中、R^{1b}は水素原子または置換基を有していてもよい脂肪族炭化水素基を、R^{1c}はR^{1b}と同一または異なって、水素原子または置換基を有していてもよい脂肪族炭化水素基を示す。)で表される基を示し、

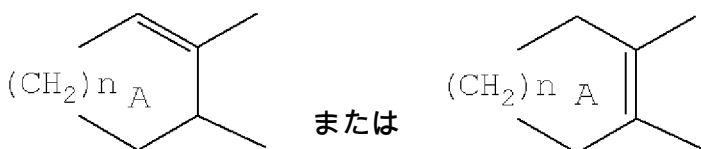
R^0は水素原子または脂肪族炭化水素基を示すか、あるいはR^1とR^0は一緒になって結合手を形成し、

環Aは(1)置換基を有していてもよい脂肪族炭化水素基、(2)置換基を有していても

よい芳香族炭化水素基、(3) 式:−OR''(式中、R''は水素原子または置換基を有していてもよい脂肪族炭化水素基を示す。)で表される基および(4)ハロゲン原子から選ばれる1〜4個で置換されたシクロアルケンを示し、Arは置換基を有していてもよい芳香族炭化水素基を示し、

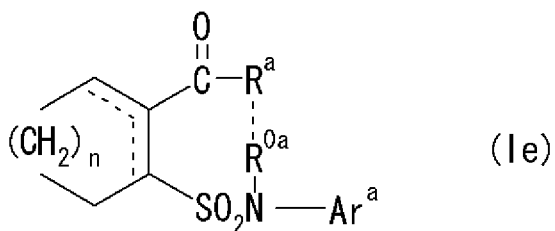
式:

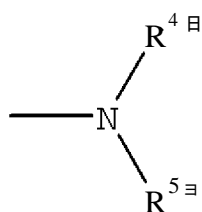
[0007] [化3]

[0008] で表される基は、式:

[0009] [化4]

[0010] で表される基を示し、nは1〜4の整数を示す。]で表される化合物、および

(ii) 式:

[0011] [化5]

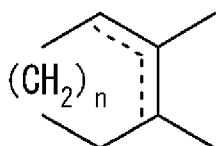
(Ie)

[0012] [式中、R''は置換基を有していてもよい脂肪族炭化水素基、置換基を有していてもよい芳香族炭化水素基、置換基を有していてもよい複素環基、式:−OR''(式中、R''は水素原子または置換基を有していてもよい脂肪族炭化水素基を示す。)で表される基または式:

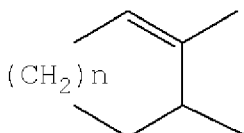
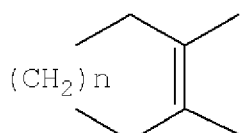
[0013] [化6]

[0014] (式中、$R^{4''}$および$R^{5''}$は同一または異なって、水素原子または置換基を有していてもよい脂肪族炭化水素基を示す。)で表される基を示し、

R^{0a}は水素原子または脂肪族炭化水素基を示すか、あるいはR''とR''は一緒になって結合手を形成し、

Ar''は置換基を有していてもよい芳香族炭化水素基を示し、

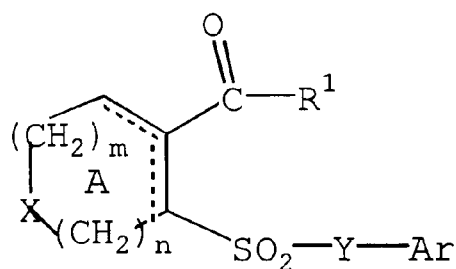
式:

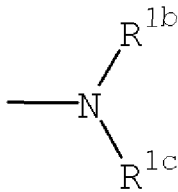
[0015] [化7]

[0016] で表される基は、式:

[0017] [化8]

[0018] で表される基を示し、

nは1～4の整数を示す。]で表される化合物、これらの化合物の塩並びにこれらのプロドラッグが、

また、特許文献2には、式:

[0019] [化9]

[0020] [式中、R^1は置換基を有していてもよい脂肪族炭化水素基、置換基を有していてもよい芳香族炭化水素基、置換基を有していてもよい複素環基、式:$-OR''$(式中、R''は水素原子または置換基を有していてもよい脂肪族炭化水素基を示す。)で表される基または式:

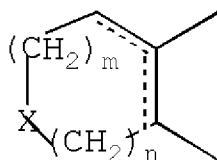
[0021] [化10]

[0022] (式中、R^{1b}およびR^{1c}は同一または異なって、水素原子または置換基を有していてもよい脂肪族炭化水素基を示す。)で表される基を示し、

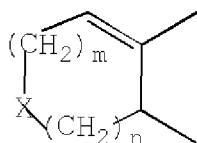
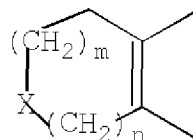
Xはメチレン基、NH、硫黄原子または酸素原子を示し、

Yは置換基を有していてもよいメチレン基または置換基を有していてもよいNHを示し、環Aは(1)置換基を有していてもよい脂肪族炭化水素基、(2)置換基を有していてもよい芳香族炭化水素基、(3)式:$-OR^2$(式中、R^2は水素原子または置換基を有していてもよい脂肪族炭化水素基を示す。)で表される基および(4)ハロゲン原子からなる群より選ばれる1乃至4個の置換基を有していてもよい5ないし8員環を示し、

Arは置換基を有していてもよい芳香族炭化水素基を示し、

式:

[0023] [化11]

[0024] で表される基は式:

[0025] [化12]

 または

[0026] で表される基を示し、

mは0乃至2の整数を示し、

nは1乃至3の整数を示し、

mとnの和は4以下である;

ただし、Xがメチレン基の場合、Yは置換基を有していてもよいメチレン基を示す。]で

表される化合物またはその塩あるいはそのプロドラッグが、一酸化窒素(NO)産生抑制作用およびTNF－α、IL－1、IL－6などの炎症性サイトカイン産生抑制作用を有しており、心疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、中枢神経系疾患、感染性疾患、セプシス、セプティックショックなどの疾患の予防・治療剤として有用であることが、それぞれ記載されている。

特許文献3には、上記の化合物がTLRシグナル阻害剤、重症セプシスの予防・治療剤として有用であることが記載されている。

特許文献1: 国際出願公開第99／46242号パンフレット

特許文献2: 国際出願公開第01／10826号パンフレット

特許文献3: 国際出願公開第03／84527号パンフレット

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0027] 本発明は、心疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、中枢神経系疾患、感染性疾患、セプシス、重症セプシスまたはセプティックショックの予防・治療薬をスクリーニングするために有用な方法を提供することを目的とする。さらに本発明は、上記疾患の予防・治療薬をスクリーニングするために有用なキットを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0028] 本発明者等は、上記の課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、TLR4のシグナル伝達阻害作用を有し、セプシス等の治療薬として有用なシクロアルケン化合物が予想外にもTLR4の細胞内領域に結合することを見出した。本発明者らは、この知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

[0029] すなわち、本発明は、

[1]TLR4の細胞内領域に結合し、該分子からのシグナル伝達を阻害する物質を選択することを特徴とする、心疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、中枢神経系疾患、感染性疾患、セプシス、重症セプシスおよびセプティックショックからなる群より選択される1以上の疾患の予防・治療薬のスクリーニング方法、

[2]当該結合部位が、配列番号:2で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号652～839で示される領域内に存在する1以上のシステイン残基である、上記[1]記載のスクリ

ーニング方法、

[3]当該結合部位が、配列番号:2で表されるアミノ酸配列の第706番目および／または第747番目のシステイン残基である、上記[2]記載のスクリーニング方法、

[4]以下の(1)〜(4)の工程を含む上記[1]記載のスクリーニング方法、

(1)TLR4またはその細胞内領域を発現し、且つNF−κBもしくはIRF3結合配列を含むプロモーターの制御下にある遺伝子を含む細胞(サンプル1)と、TLR4の細胞内領域の1以上のシステイン残基あるいはその近傍アミノ酸を他のアミノ酸に変異させた蛋白質またはその細胞内領域を発現し、且つNF−κBもしくはIRF3結合配列を含むプロモーターの制御下にある遺伝子を含む細胞(サンプル2)とをそれぞれ調製する。

(2)試験化合物の存在下でサンプル1およびサンプル2をそれぞれ培養する。

(3)培養後、サンプル1およびサンプル2における当該遺伝子の発現を測定する。

(4)サンプル1における当該遺伝子の発現量が、サンプル2におけるそれに比べて約20%以上減少した場合に、当該試験化合物を、TLR4の細胞内領域内で該分子と結合して、該分子からのシグナル伝達を阻害する物質として選択する。

[5]当該システイン残基が、配列番号:2で表されるアミノ酸配列の第706番目および／または第747番目のシステイン残基である、上記[4]記載のスクリーニング方法、

[6] 当該遺伝子がレポーター遺伝子である、上記[4]記載のスクリーニング方法、

[7]以下の(1)〜(2)の構成を含むことを特徴とする、TLR4の細胞内領域に結合して該分子からのシグナル伝達を阻害する物質を選択するためのスクリーニングキット:

(1)TLR4またはその細胞内領域を発現し、且つNF−κBもしくはIRF3結合配列を含むプロモーターの制御下にある遺伝子を含む細胞、

(2)TLR4の細胞内領域の1以上のシステイン残基あるいはその近傍アミノ酸を他のアミノ酸に変異させた蛋白質またはその細胞内領域を発現し、且つNF−κBもしくはIRF3結合配列を含むプロモーターの制御下にある遺伝子を含む細胞、および

[8]TLR4の細胞内領域に結合して該分子からのシグナル伝達を阻害する物質が、心疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、中枢神経系疾患、感染性疾患、セプシス、重症セプシスおよびセプティックショックからなる群より選択される1以上の疾患の予防・

治療薬である上記[7]記載のスクリーニングキットに関する。

発明の効果

[0030] 本発明のスクリーニング法は、試験化合物のTLR4の細胞内領域への結合と、該結合による該受容体からのシグナル伝達阻害を検定することにより、心疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、中枢神経系疾患、感染性疾患、セプシス、重症セプシスまたはセプティックショックの予防・治療活性を有する物質を効率よく選択し得るれづ効果を奏する。

図面の簡単な説明

[0031] [図1]TIRAP、TLR2のTIRドメイン、TLR4のTIRドメインとGSTとの融合蛋白質と^{3}Hラベルした化合物Aとの反応物をゲル電気泳動したもののCBB染色像(A)およびオートラジオグラフ(B)を示す図である。レーン1:GST;レーン2:GST－TIRAP融合蛋白質;レーン3:GST－TLR2細胞内TIRドメイン融合蛋白質;レーン4:GST－TLR4細胞内TIRドメイン融合蛋白質

[図2]野生型TLR4および各種変異TLR4への^{3}Hラベルした化合物Aの結合能を示す図である。上段パネルはTLR蛋白質発現量を示すイムノブロット像、下段パネルは化合物Aの結合を示すオートラジオグラフを示す。WT:野生型TLR4;1CA:TLR4^{C666A}(第666番目のCがAに置換されていることを示す。以下同様);2CA:TLR^{C706A};3CA:TLR4^{C747A};4CA:TLR^{C831A};PH:TLR^{P714H};1KR:TLR^{K653R};2KR:TLR^{K666R};3KR:TLR^{K694R};4KR:TLR^{K729R};5KR:TLR^{K732R};6KR:TLR^{K773R};7KR:TLR^{K776R};8KR:TLR^{K813R};9KR:TLR^{K819R}

[図3]野生型TLR4および各種変異TLR4を発現する細胞を、化合物A(図3－1)、化合物B(図3－2)、化合物C(図3－3)、化合物D(図3－4)の存在下および非存在下でLPS刺激を与えて培養した場合の、NF－ Bの制御下にあるルシフェラーゼ遺伝子の発現量を示す図である。WT:野生型TLR4;1CA:TLR4^{C666A};2CA:TLR^{C706A};3CA:TLR4^{C747A};4CA:TLR^{C831A};PH:TLR^{P714H};1KR:TLR^{K653R};2KR:TLR^{K666R};3KR:TLR^{K694R};4KR:TLR^{K729R};5KR:TLR^{K732R};6KR:TLR^{K773R};7KR:TLR^{K776R};8KR:TLR^{K813R};9KR:TLR^{K819R};EV:ベクターのみ

[0032] 本発明のスクリーニング方法は、TLR4の細胞内領域に結合し、TLR4のシグナル

伝達を阻害する物質を選択することを特徴とする。

TLR4は1回膜貫通型受容体であり、N末端側から細胞外領域、膜貫通領域および細胞内領域を有する。「TLR4の細胞内領域」とは、例えば、配列番号:2で表わされるヒトTLR4の場合、アミノ酸番号652〜839で示されるアミノ酸配列からなる領域を意味する。

「TLR4のシグナル伝達の阻害」としては、結果的にNF-κB依存性の炎症性サイトカイン誘導やIRF3依存性のインターフェロンおよびインターフェロン誘導性遺伝子の発現誘導に至らない限り、TLR4からのシグナル伝達のいかなる過程を阻害してもよい。

[0033] 本発明のスクリーニング方法により選択されるTLR4からのシグナル伝達阻害物質は、TLR4の細胞内領域のいかなる部位に結合してもよく、細胞内領域の1つの部位に結合してもよいし、複数の部位に結合してもよい。好ましくは、該シグナル阻害物質は、TLR4の細胞内領域内の1個以上のシステイン残基(例えば、配列番号:2で表されるヒトTLR4の場合、該アミノ酸配列の第664番目、第706番目、第747番目および第831番目のシステイン残基)、より好ましくは、細胞質内におけるシグナル経路を活性化するToll-IL-1 receptor (TIR) ドメイン(ヒトTLR4の場合、配列番号:2で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号674〜839で示される領域)内に存在する1個以上のシステイン残基、さらに好ましくは、配列番号:2で表されるアミノ酸配列の第706番目および/または第747番目のシステイン残基に結合する。

[0034] TLR4の細胞内領域に結合して該分子からのシグナル伝達を阻害する物質を選択する、本発明のスクリーニング方法は、TLR4の細胞内領域の全部もしくは一部を含むポリペプチドを用いることを特徴とする。

本発明のスクリーニング方法に用いられる上記ポリペプチドは、目的とするシグナル伝達阻害物質が標的とする結合部位を最低限含んでいればよく、該結合部位はTLR4の細胞内領域内で任意に設定することができるが、好ましくは上記したシステイン残基である。したがって、より好ましくは、本発明のスクリーニング方法に用いられるポリペプチドは、少なくとも配列番号:2で表わされるアミノ酸配列の第706番目および/または第747番目のシステイン残基を含む、該アミノ酸配列の部分アミノ酸配列を

含むポリペプチドである。該ポリペプチドの長さは、目的とするシグナル伝達阻害物質が標的とする結合部位に結合し得るに十分な隣接アミノ酸配列を含む限り特に制限はなく、例えば、10アミノ酸以上、好ましくは50アミノ酸以上、より好ましくは100アミノ酸以上、さらに好ましくは200アミノ酸以上である。該ポリペプチド長の上限も特に制限はないが、例えばTLR4の全長（ヒトTLR4の場合、839アミノ酸（シグナルペプチドを含む））等が挙げられる。

[0035] 例えば、該ポリペプチドの長さを短くすれば、シグナル伝達阻害物質の結合部位の特定が容易となる反面、該ポリペプチドはシグナル伝達作用を喪失している場合が多いので、該ポリペプチドに結合した試験化合物について、シグナル伝達阻害作用の有無を別途試験する必要がある。したがって、試験化合物の標的部位への結合とシグナル伝達阻害作用とを同時に検定するには、本発明で用いられるポリペプチドは、TLR4がシグナル伝達作用を発揮するのに必要な領域を少なくとも含んでいる必要があり、例えば、上記TIRドメインを含むポリペプチド、細胞内領域全体を含むポリペプチド、さらに膜貫通領域を含むポリペプチド、あるいはTLR4全長などであることが望ましい。この場合、試験化合物が所望の標的部位に結合するか否かは、後述するように、該標的部位のアミノ酸を欠失させるか、他のアミノ酸で置換したポリペプチドを作製し、該ポリペプチドへの試験化合物の結合能の有無を調べることにより検定することができる。

一方、該ポリペプチドと試験化合物との結合の検出を容易にする目的で、該ポリペプチドはN末端もしくはC末端にタグを有する融合ポリペプチドとして提供されてもよい。そのようなタグの例としては、GSTタグ、His_6タグ、MBPタグ、Flagタグ、などが挙げられる。このようなタグ配列を含むポリペプチドは、それぞれグルタチオン、金属キレート、マルトース、抗Flag抗体担体を用いてプルダウンすることができ、試験化合物をRI（例えば^{3}H、^{35}S、^{32}P等）などでラベルしておけば、該担体上のラベルを測定することにより容易に試験化合物の該ポリペプチドへの結合を検出することができる。

[0036] 本発明におけるTLR4蛋白質は、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質である。

TLR4蛋白質は、温血動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウ

サギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)の細胞[例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球、樹状細胞)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など]もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織[例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、脂肪組織、骨格筋、腹膜など]に由来する蛋白質であってよく、また、化学合成もしくは無細胞翻訳系で合成された蛋白質であってもよい。あるいは上記アミノ酸配列をコードする塩基配列を含有する核酸を導入された形質転換体から産生された組換え蛋白質であってもよい。

[0037] 配列番号:2で表わされるアミノ酸配列と「実質的に同一のアミノ酸配列」とは、配列番号:2で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、特に好ましくは約95%以上、最も好ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列をいう。ここで「相同性」とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて2つのアミノ酸配列をアラインさせた場合の、最適なアラインメント(好ましくは、該アルゴリズムは最適なアラインメントのために配列の一方もしくは両方へのギャップの導入を考慮し得るものである)における、オーバーラップする全アミノ酸残基に対する同一アミノ酸および類似アミノ酸残基の割合(%)を意味する。「類似アミノ酸」とは物理化学的性質において類似したアミノ酸を意味し、例えば、芳香族アミノ酸(Phe、Trp、Tyr)、脂肪族アミノ酸(Ala、Leu、Ile、Val)、極性アミノ酸(Gln、Asn)、塩基性アミノ酸(Lys、Arg、His)、酸性アミノ酸(Glu、Asp)、水酸基を有するアミノ酸(Ser、Thr)、側鎖の小さいアミノ酸(Gly、Ala、Ser、Thr、Met)などの同じグループに分類されるアミノ酸が挙げられる。このような類似アミノ酸による置換は蛋白

質の表現型に変化をもたらさない(即ち、保存的アミノ酸置換であることが予測される。保存的アミノ酸置換の具体例は当該技術分野で周知であり、種々の文献に記載されている(例えば、Bowieら,Science, 247 : 1306-1310(1990)を参照)。

[0038] 本明細書におけるアミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)を用い、以下の条件(期待値=10;ギャップを許す;マトリクス=BLOSUM62;フィルタリング=OFF)にて計算することができる。アミノ酸配列の相同性を決定するための他のアルゴリズムとしては、例えば、Karlinら,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873 -5877 (1993) に記載のアルゴリズム[該アルゴリズムはNBLASTおよびXBLASTプログラム(version 2.0)に組み込まれている(Altschulら, Nucleic Acids Res., 25: 3389 -3402 (1997))]、Needlemanら,J. Mol. Biol., 48: 444 -453 (1970)に記載のアルゴリズム[該アルゴリズムはGCG ソフトウェアパッケージ中のGapプログラムに組み込まれている]、MyersおよびMiller, CABIOS, 4: 11-17 (1988) に記載のアルゴリズム[該アルゴリズムはCGC 配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(version 2.0)に組み込まれている]、Pearsonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444 -2448 (1988)に記載のアルゴリズム[該アルゴリズムはGCG ソフトウェアパッケージ中のFASTAプログラムに組み込まれている]等が挙げられ、それらも同様に好ましく用いられ得る。

[0039] より好ましくは、「実質的に同一のアミノ酸配列」とは、配列番号:2で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、特に好ましくは約95%以上、最も好ましくは約98%以上の同一性を有するアミノ酸配列である。

[0040] 配列番号:2で表わされるアミノ酸配列と「実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質」とは、前記の配列番号:2で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号:2で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をいう。

「実質的に同質の活性」とは、(1) シグナル伝達活性(即ち、LPS刺激によりNF-κBおよび/またはIRF3の活性化をし、炎症性サイトカインおよび/またはインター

フェロンおよびインターフェロン誘導性遺伝子の発現を誘導する活性）、並びに(2) TLR4の細胞内領域に結合して上記シグナル伝達を阻害する化合物との結合活性をいう。実質的に同質とは、それらの活性が定性的に同様であることを示す。従って、シグナル伝達活性およびシグナル伝達阻害物質との結合活性が同等であることが好ましいが、これらの活性の程度、蛋白質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい（例えば、活性については、約0．01～約100倍、好ましくは約0．1～約10倍、より好ましくは約0．5～約2倍の範囲内が挙げられる）。

TLR4のシグナル伝達活性は、公知の方法、例えば、TLR4発現細胞における炎症性サイトカイン（例えば、TNFα、IL－1、IL－6、IFN－γ等）やインターフェロン（IFN－β、IFN－α）もしくはインターフェロン誘導性遺伝子（例えば、IP－10、GARG16、IRG－1等）の発現変動を測定したり、転写因子（例えば、NF－κB、IRF3、AP－1、C/EBP）の活性化を、それらの転写因子に特異的なシスエレメントを含むプロモーターの制御下にあるレポーター遺伝子の発現を指標として測定することができるが、それらに限定されない。一方、シグナル伝達阻害物質との結合活性は、例えば、上述のプルダウンアッセイや表面プラズモン共鳴（SPR）、蛍光エネルギー転移等を用いて測定することができる。あるいは後述するように、所望の標的部位のアミノ酸を欠失させるか、他のアミノ酸で置換した変異ポリペプチドを別に作製し、野生型ポリペプチドと変異ポリペプチドのそれぞれについて試験化合物の存在下で上記のようにしてシグナル伝達活性を測定することにより、試験化合物の結合活性とシグナル伝達阻害とを一括して検定することもできる。

[0041] また、本発明で用いられるTLR4には、例えば、(1) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列の1または2個以上（例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(3) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(4) 配列番号：2で表さ

れるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑸それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質も含まれる。

但し、1または2個以上のアミノ酸を欠失する場合、該欠失部位は所望のシグナル伝達阻害物質の結合部位以外の部位であり、好ましくは細胞内領域のシステイン残基およびその近傍以外の部位である。また、1または2個以上のアミノ酸が挿入されるか、他のアミノ酸で置換される場合、所望のシグナル伝達阻害物質の結合部位以外の部位（好ましくは細胞内領域のシステイン残基およびその近傍以外の部位）であるか、あるいは当該部位であっても、その挿入もしくは置換の結果、当該部位の活性（即ち、当該部位に結合するTLR4シグナル伝達阻害物質と結合する活性）に質的な影響を与えないものである必要がある。

[0012] 本明細書に記載される蛋白質およびペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。本発明のスクリーニング方法に用いられるTLR4は、C末端がカルボキシル基（$-COOH$）、カルボキシレート（$-COO^-$）、アミド（$-CONH_2$）またはエステル（$-COOR$）の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n－プロピル、イソプロピル、n－ブチルなどのC_{1-6}アルキル基；例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC_{3-8}シクロアルキル基；例えば、フェニル、α－ナフチルなどのC_{6-12}アリール基；例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル－C_{1-2}アルキル基；α－ナフチルメチルなどのα－ナフチル－C_{1-2}アルキル基などのC_{7-14}アラルキル基；ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

TLR4がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のTLR4に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

[0013] さらに、TLR4には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護

基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC_{1-6}アルカノイルなどのC_{1-6}アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば－OH、－SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC_{1-6}アルカノイル基などのC_{1-6}アシル基な図で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

[0044] 本発明で用いられるTLR4の部分ペプチドは、上記したTLR4の部分アミノ酸配列（即ち、細胞内領域の一部もしくは全部の配列）を有し、且つTLR4と実質的に同質の活性を有するペプチドである。ここで「実質的に同質の活性」とはTLR4の細胞内領域に結合して上記シグナル伝達を阻害する化合物との結合活性をいう。好ましくは、該部分ペプチドは、シグナル伝達活性（即ち、LPS刺激によりNF－ Bおよび／またはIRF3の活性化をし、炎症性サイトカインおよび／またはインターフェロンおよびインターフェロン誘導性遺伝子の発現を誘導する活性）をさらに保持するものである。「実質的に同質の活性」の測定はTLR4において上記したと同様の方法で行うことができる。

本明細書においては、TLR4蛋白質および当該部分ペプチドを、以下「阻害物質結合型ポリペプチド」と称することもある。

[0045] TLR4の部分ペプチドは、C末端がカルボキシル基（－COOH）、カルボキシレート（$-COO^{-}$）、アミド（$-CONH_2$）またはエステル（－COOR）の何れであってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、TLR4について前記したと同様のものが挙げられる。これらのペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

[0046] さらに、TLR4の部分ペプチドには、上記したTLR4と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保

護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

[0047] TLR4またはその部分ペプチドは遊離体であってもよいし、塩であってもよい。TLR4またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、穆酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

[0048] 一方、TLR4またはその部分ペプチドにおいて、所望のシグナル伝達阻害物質の結合部位(好ましくは細胞内領域のシステイン残基、例えば、配列番号:2で表されるヒトTLR4においては、該アミノ酸配列の第664番目、第706番目、第747番目および第831番目のシステイン残基の1以上、より好ましくは第706番目および/または第747番目のシステイン残基)が欠失するか、あるいは他のアミノ酸(例えば、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシンなどが挙げられるが、それらに限定されない。好ましくはアラニンが挙げられる)で置換されたポリペプチドは、目的とするシグナル伝達阻害物質に対する結合活性がないので、該標的結合部位に特異的に結合してシグナル伝達を阻害する化合物と接触させてもこれと結合しない。また、当該変異部分ペプチドがシグナル伝達活性をさらに保持するものである場合、該標的結合部位に特異的に結合してシグナル伝達を阻害する化合物と接触させてもシグナル伝達は阻害されない。

本明細書においては、当該変異TLRおよび変異部分ペプチドを、以下「阻害物質非結合型ポリペプチド」と称することもある。

[0049] TLR4またはその塩は、前述した温血動物の細胞または組織から自体公知の蛋白質の精製方法によって調製することができる。具体的には、温血動物の組織または細胞をホモジナイズし、可溶性画分を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー等で分離精製することによって、TLR4またはその塩を製造することができる。

[0050] TLR4またはその部分ペプチドは、公知のペプチド合成法に従って製造することもできる。

ペプチド合成法は、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれであってもよい。TLR4を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合し、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的とする蛋白質を製造することができる。

ここで、縮合や保護基の脱離は、自体公知の方法、例えば、以下の(1)~(5)に記載された方法に従って行われる。

(1) M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチドシンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

(2) SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

(3) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

(4) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学IV、205、(1977年)

(5) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

[0051] このようにして得られたTLR4またはその部分ペプチドは、公知の精製法により単離・精製することができる。ここで、精製法としては、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶、これらの組み合わせなどが挙げられる。

[0052] 上記方法で得られるTLR4またはその部分ペプチドが遊離体である場合には、該遊離体を公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆にTLR4またはその部分ペプチドが塩として得られた場合には、該塩を公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

[0053] TLR4またはその部分ペプチドの合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4－ベンジルオキシベンジルアル

コール樹脂、4－メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4－ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4－(2', 4'－ジメトキシフェニル－ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4－(2', 4'－ジメトキシフェニル－Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、α－アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質もしくはペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質(ペプチド)を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質(ペプチド)またはそのアミド体を取得する。

[0054] 上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'－ジイソプロピルカルボジイミド、N－エチル－N'－(3－ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBt、HOOBt)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

[0055] 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒は、蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N－ジメチルホルムアミド、N, N－ジメチルアセトアミド、N－メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどのアミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約－20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な

縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

[0056] 原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および用いられる保護基、その保護基の脱離、並びに反応に関与する官能基の活性化などは、公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4－メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl－Z、Br－Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2－ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化(例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2－アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)、アラルキルエステル化(例えば、ベンジルエステル、4－ニトロベンジルエステル、4－メトキシベンジルエステル、4－クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

[0057] セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t－ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl_2－Bzl、2－ニトロベンジル、Br－Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4－メトキシ－2,3,6－トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

[0058] 保護基の除去(脱離)方法としては、例えば、Pd−黒あるいはPd−炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約−20℃〜40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4−ブタンジチオール、1,2−エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4−ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2−エタンジチオール、1,4−ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

[0059] 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール(例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5−トリクロロフェノール、2,4−ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N−ヒドロキシスクシミド、N−ヒドロキシフタルイミド、HOBt)とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

[0060] 蛋白質(ペプチド)のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、蛋白質(ペプチド)を構成する部分ペプチドの各C末端アミノ酸のα−カルボキシル基をアミド化して保護し、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長(隣接する部分ペプチドのC末端アミノ酸と連結されるべきアミノ酸)まで延ばした後、C末端側ペプチド鎖のN末端アミノ酸のα−アミノ基の保護基のみを除いたペプチドと、N末端側ペプチド鎖のC末端アミノ酸のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチドとを製造し、これらのペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる方法が挙げられる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護蛋白質(保護ペプチド)を精製

した後、上記方法によって保護基を除去し、所望の粗蛋白質（粗ペプチド）を得ることができる。この粗蛋白質（粗ペプチド）は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の蛋白質（ペプチド）のアミド体を得ることができる。

[0061] 蛋白質（ペプチド）のエステル体は、例えば、C末端アミノ酸のα－カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合してアミノ酸エステルとした後、上記のアミド体の場合と同様に処理して得ることができる。

[0062] TLR4の部分ペプチドまたはその塩は、TLR4またはその塩を適当なペプチダーゼで切断することによっても製造することができる。

[0063] さらに、TLR4またはその部分ペプチドは、それをコードする核酸を含有する形質転換体を培養し、得られる培養物からTLR4またはその部分ペプチドを分離精製することによって製造することもできる。

TLR4またはその部分ペプチドをコードする核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA／RNAキメラであってもよい。好ましくはDNAが挙げられる。また、該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA：RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（即ち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（即ち、非コード鎖）であってもよい。

[0064] TLR4またはその部分ペプチドをコードするDNAとしては、ゲノムDNA、温血動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）のあらゆる細胞［例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球、樹状細胞）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞などや血球系の細胞］、あるいはそれらの細胞が存在するあらゆる組織［例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁頭核、大脳基底球、

海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳染、黒質)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋、腹膜など]由来のcDNA、合成DNAなどが挙げられる。TLR4またはその部分ペプチドをコードするゲノムDNAおよびcDNAは、上記した細胞・組織より調製したゲノムDNA画分および全RNAもしくはmRNA画分をそれぞれ鋳型として用い、Polymerase Chain Reaction(以下、「PCR法」と略称する)およびReverse Transcriptase-PCR(以下、「RT-PCR法」と略称する)によって直接増幅することもできる。あるいは、TLR4またはその部分ペプチドをコードするゲノムDNAおよびcDNAは、上記した細胞・組織より調製したゲノムDNAおよび全RNAもしくはmRNAの断片を適当なベクター中に挿入して調製されるゲノムDNAライブラリーおよびcDNAライブラリーから、コロニーもしくはプラークハイブリダイゼーション法またはPCR法などにより、それぞれクローニングすることもできる。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。

[0065] TLR4をコードするDNAとしては、例えば、配列番号1で表される塩基配列を含有するDNA、あるいは配列番号1で表される塩基配列の相補鎖配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号:2で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性(即ち、シグナル伝達活性および標的結合部位でのTLR4シグナル伝達阻害物質との結合活性など)を有する蛋白質をコードするDNAなどが挙げられる。

配列番号1で表される塩基配列の相補鎖配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号1で表される塩基配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

[0066] 本明細書における塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST(National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)を用い、以下の条件(期待値=10;ギャップを許す;フィルタリング=ON;マッチスコア=1;

ミスマッチスコア=-3)にて計算することができる。塩基配列の相同性を決定するための他のアルゴリズムとしては、上記したアミノ酸配列の相同性計算アルゴリズムが同様に好ましく例示される。

[0067] ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)第2版(J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。ハイブリダイゼーションは、好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

[0068] ハイストリンジェントな条件としては、例えば、ナトリウム塩濃度が約19~約40mM、好ましくは約19~約20mMで、温度が約50~約70℃、好ましくは約60~約65℃の条件等が挙げられる。特に、ナトリウム塩濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が好ましい。当業者は、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度、ハイブリダゼーション反応の温度、プローブ濃度、プローブの長さ、ミスマッチの数、ハイブリダイゼーション反応の時間、洗浄液の塩濃度、洗浄の温度等を適宜変更することにより、所望のストリンジェンシーに容易に調節することができる。

[0069] TLR4をコードするDNAは、好ましくは配列番号1で表される塩基配列を含有するヒトTLR4DNAもしくはそのアレル変異体、または他の温血動物(例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)におけるそのオルソログ(ortholog)等である。

[0070] 阻害物質結合型ポリペプチド(部分ペプチド)をコードするDNAは、TLR4の細胞内領域の全部もしくは一部[目的とするTLR4シグナル伝達阻害物質の標的結合部位(好ましくは細胞内領域のシステイン残基、例えば、配列番号:2で表されるヒトTLR4においては、該アミノ酸配列の第664番目、第706番目、第747番目および第831番目のシステイン残基の1個以上、より好ましくは第706番目および/または第747番目のシステイン残基)を少なくとも含む]をコードする塩基配列を含むものであればいかなるものであってもよい。

[0071] また、阻害物質非結合型ポリペプチドをコードするDNAは、TLR4もしくはその部

分ペプチドをコードする塩基配列において、目的とするTLR4シグナル伝達阻害物質の標的結合部位(好ましくは細胞内領域のシステイン残基、例えば、配列番号:2で表されるヒトTLR4においては、該アミノ酸配列の第664番目、第706番目、第747番目および第831番目のシステイン残基の1以上、より好ましくは第706番目および/または第747番目のシステイン残基)をコードするコドンが欠失するか、あるいは他のアミノ酸(例えば、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシンなどが挙げられるが、それらに限定されない。好ましくはアラニンが挙げられる)をコードするコドンで置換された塩基配列を含むものであればいかなるものであってもよい。

[0072] TLR4またはその部分ペプチドをコードするDNAは、該蛋白質またはペプチドをコードする塩基配列の一部分を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当な発現ベクターに組み込んだDNAを、本発明の蛋白質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを標識したものとハイブリダイゼーションすることによってクローニングすることができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)第2版(前述)に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、該ライブラリーに添付された使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

[0073] DNAの塩基配列は、公知のキット、例えば、Mutan™-Super Express Km(宝酒造(株))、Mutan™-K(宝酒造(株))等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って変換することができる。従って、阻害物質非結合型ポリペプチドをコードするDNAは、阻害物質結合型ポリペプチドをコードするDNAに、上記方法に従って変異を導入することにより得ることができる。

[0074] クローン化されたDNAは、目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化するか、リンカーを付加した後に、使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することができる。

[0075] 上記のTLR4またはその部分ペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターで宿主を形質転換し、得られる形質転換体を培養することによって、該蛋白質またはペプチドを製造することができる。

TLR4またはその部分ペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターは、例えば、TLR4をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

[0076] 発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13);枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194);酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15);λファージなどのバクテリオファージ;レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルス;pA1－11、pXT1、pRc／CMV、pRc／RSV、pcDNAI／Neoなどが用いられる。

プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

[0077] 例えば、宿主が動物細胞である場合、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、HSV-TKプロモーターなどが用いられる。なかでも、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどが好ましい。

宿主がエシェリヒア属菌である場合、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP_Lプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが好ましい。

宿主がバチルス属菌である場合、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。

宿主が酵母である場合、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。

宿主が昆虫細胞である場合、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

[0078] 発現ベクターとしては、上記の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとし

ては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子(メソトレキセート(MTX)耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp"と略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、Neo"と略称する場合がある、G418耐性)等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター卵巣細胞を用い、dhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によって選択することもできる。

[0079] また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列をコードする塩基配列(シグナルコドン)を、TLR4またはその部分ペプチドをコードするDNAの5'末端側に付加するか、あるいはネイティブなシグナル配列(もしくはプレプロ配列)と置換してもよい。宿主がエシェリヒア属菌である場合、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが;宿主がバチルス属菌である場合、α－アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが;宿主が酵母である場合、MFα・シグナル配列、SUC2・シグナル配列などが;宿主が動物細胞である場合、インシュリン・シグナル配列、α－インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ用いられる。

[0080] 宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、例えば、大腸菌(Escherichia coli)K12・DH1(プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA),60巻,160(1968))、JM103〔ヌクイレック・アシッズ・リサーチ(Nucleic Acids Research),9巻,309(1981))、JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology),120巻,517(1978)〕、HB101〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー,41巻,459(1969))、C600〔ジェネティックス(Genetics),39巻,440(1954))などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、枯草菌(Bacillus subtilis)MI114(ジーン,24巻,255(1983)),207－21(ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(Journal of Biochemistry),95巻,87(1984))などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)AH22、AH22R⁻、NA87－11A、DKD－5D、20B－12、シゾサッカロマイセス ポ

ンベ(Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913、NCYC2036、ピキア パストリス(Pichia pastoris)KM71などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞(Spodoptera frugiperda cell;Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five™細胞、Mamestra brassicae由来の細胞、Estigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合、昆虫細胞としては、蚕由来株化細胞(Bombyx mori N 細胞;BmN細胞)などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞(ATCC CRL1711)、Sf21細胞(以上、Vaughn,J.L.ら,イン・ヴィボ(In Vivo),13,213−217(1977))などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら,ネイチャー(Nature),315巻,592(1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS−7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞(以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター卵巣細胞(以下、CHO(dhfr^{-})細胞と略記)、マウスL細胞、マウスAtT−20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3細胞、ヒトFL細胞、HEK293細胞、HeLa細胞などが用いられる。

[0081] 形質転換は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

エシェリヒア属菌は、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンジイズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA),69巻,2110(1972)やジーン(Gene),17巻,107(1982)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

バチルス属菌は、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス(Molecular & General Genetics),168巻,111(1979)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

酵母は、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology),194巻,182−187(1991)、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA),75巻,1929(1978)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

昆虫細胞および昆虫は、例えば、バイオノテクノロジー(Bio/Technology) 6巻,47−55(1988) などに記載の方法に従って形質転換することができる。

動物細胞は、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール.263−267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー(Virology),52巻,456 (1973) に記載の方法に従って形質転換することができる。

[0082] 形質転換体の培養は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

例えば、宿主がエシェリヒア属菌またはバチルス属菌である形質転換体を培養する場合、培養に使用される培地としては液体培地が好ましい。また、培地は、形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物などを含有することが好ましい。ここで、炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖などが;窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質が;無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがそれぞれ挙げられる。また、培地には、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは、好ましくは約5〜8である。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地(ミラー(Miller),ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス(Journal of Experiments in Molecular Genetics),431−433,Cold Spring Harbor Laboratory,New York 1972)が好ましい。必要により、プロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β−インドリルアクリル酸のような薬剤を培地に添加してもよい。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体の培養は、通常約15〜43℃で、約3〜24時間行なわれる。必要により、通気や撹拌を行ってもよい。

宿主がバチルス属菌である形質転換体の培養は、通常約30〜40℃で、約6〜24時間行なわれる。必要により、通気や撹拌を行ってもよい。

宿主が酵母である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、バークホールダー(Burkholder)最小培地(Bostian,K.L.ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナシ

ョナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地(Bitter, G. A. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984))などが挙げられる。培地のpHは、好ましくは約5～8である。培養は、通常約20℃～35℃で、約24～72時間行なわれる。必要に応じて、通気や撹拌を行ってもよい。

[0083] 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えばGrace's Insect Medium(Grace, T.C.C.ネイチャー(Nature), 195巻, 788 (1962))に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは、好ましくは約6.2～6.4である。培養は、通常約27℃で、約3～5日間行なわれる。必要に応じて通気や撹拌を行ってもよい。

[0084] 宿主が動物細胞である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地(サイエンス(Science), 122巻, 501 (1952))、DMEM培地(ヴィロロジー(Virology), 8巻, 396 (1959))、RPMI 1640培地(ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association), 199巻, 519 (1967))、199培地(プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950))などが用いられる。培地のpHは、好ましくは約6～8である。培養は、通常約30℃～40℃で、約15～60時間行なわれる。必要に応じて通気や撹拌を行ってもよい。

[0085] 以上のようにして、形質転換体の細胞内または細胞外にTLR4またはその部分ペプチドを生成させることができる。

前記形質転換体を培養して得られる培養物から、TLR4またはその部分ペプチドを自体公知の方法に従って分離精製することができる。

例えば、TLR4またはその部分ペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出する場合、培養物から公知の方法で集めた菌体あるいは細胞を適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊した後、遠心分離やろ過により可溶性蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられ

る。該緩衝液は、尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX－100™などの界面活性剤を含んでいてもよい。

[0086] このようにして得られた可溶性画分中に含まれるTLR4またはその部分ペプチドの単離精製は、自体公知の方法に従って行うことができる。このような方法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法；透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法；イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法；アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法；逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法；等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法；などが用いられる。これらの方法は、適宜組み合わせることもできる。

[0087] かくして得られるTLR4またはその部分ペプチドが遊離体である場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって該遊離体を塩に変換することができ、該蛋白質またはペプチドが塩として得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により該塩を遊離体または他の塩に変換することができる。

[0088] なお、形質転換体が産生するTLR4またはその部分ペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。該蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

[0089] かくして得られるTLR4またはその部分ペプチドの存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより確認することができる。

[0090] さらに、TLR4またはその部分ペプチドは、それをコードするDNAに対応するRNAを鋳型として、ウサギ網状赤血球ライセート、コムギ胚芽ライセート、大腸菌ライセートなどからなる無細胞蛋白質翻訳系を用いてインビトロ翻訳することによっても合成することができる。あるいは、さらにRNAポリメラーゼを含む無細胞転写／翻訳系を用いて、TLR4またはその部分ペプチドをコードするDNAを鋳型としても合成することができる。無細胞蛋白質(転写)翻訳系は市販のものを用いることもできるし、それ自体既知の方法、具体的には大腸菌抽出液はPratt J.M. et al., Transcription and Tra

nlation, 179−209, Hames B.D. & Higgins S.J. eds., IRL Press, Oxford (1984)に記載の方法等に準じて調製することもできる。市販の細胞ライセートとしては、大腸菌由来のものはE. coli S30 extract system (Promega社製)やRTS 500 Rapid Tranlation System (Roche社製)等が挙げられ、ウサギ網状赤血球由来のものはRabbit Reticulocyte Lysate System (Promega社製)等、さらにコムギ胚芽由来のものはPROTEIOS™ (TOYOBO 社製)等が挙げられる。このうちコムギ胚芽ライセートを用いたものが好適である。コムギ胚芽ライセートの作製法としては、例えばJohnston F.B. et al. ,Nature, 179, 160−161 (1957)あるいはErickson A.H. et al., Meth. Enzymol., 96, 38−50 (1996)等に記載の方法を用いることができる。

[0091] 蛋白質合成のためのシステムまたは装置としては、バッチ法(Pratt J.M. et al. (1984) 前述)や、アミノ酸、エネルギー源等を連続的に反応系に供給する連続式無細胞蛋白質合成システム(Spirin A.S. et al., Science, 242, 1162−1164 (1988))、透析法(木川等、第21回日本分子生物学会、WID6)、あるいは重層法(PROTEIOS™ Wheat germ cell−free protein synthesis core kit取扱説明書:TOYOBO社製)等が挙げられる。さらには、合成反応系に、鋳型のRNA、アミノ酸、エネルギー源等を必要時に供給し、合成物や分解物を必要時に排出する方法(特開2000−333673)等を用いることができる。

[0092] 本発明のスクリーニング方法は、上記のいずれかの方法によって得られる阻害物質結合型ポリペプチドを用いて、該ポリペプチドのTLR4細胞内領域への試験化合物の結合、および該ポリペプチドがシグナル伝達活性を保持する場合には、試験化合物存在下でのシグナル伝達活性を測定することを特徴とする。

具体的には、例えば、TLR4細胞内領域への試験化合物の結合は、阻害物質結合型ポリペプチドを固相化(例えば、マイクロプレートなど)して、標識した試験化合物を含む溶液を該固相に添加して一定時間インキュベートした後、溶液を除去し、固相に吸着した標識量を測定することにより行うことができる。あるいは、阻害物質結合型ポリペプチドが適当なタグ(例えば、GSTタグ、Hisタグ、MBPタグ)を有する融合ポリペプチドである場合には、該ポリペプチドと標識した試験化合物とを溶液中で反応させた後、該タグ配列と特異的に結合する物質を含む担体(例えば、グルタチオン、金

属キレート、マルトース等を固相化したビーズなど)を用いて該ポリペプチドをプルダウンし、固相に吸着した標識量を測定することによっても試験化合物のTLR4細胞内領域への結合を検定することができる。標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、〔^{125}I〕、〔^{131}I〕、〔^{3}H〕、〔^{14}C〕などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。

[0093] あるいは、阻害物質結合型ポリペプチドと試験化合物との結合は、例えば、表面プラズモン共鳴(SPR)法を用いて、市販のセンサーチップ(例えば、Biacore製)の表面上に、常法に従って阻害物質結合型ポリペプチドを固定化し、これに試験化合物を接触させた後、該センサーチップに特定の波長の光を特定の角度から照射し、共鳴角度の変化を指標にして、固定化した阻害物質結合型ポリペプチドへの試験化合物の結合の有無を判定することができる。あるいはまた、質量分析計に適合可能なプロテインチップの表面上に阻害物質結合型ポリペプチドを固定化し、これに試験化合物を接触させた後、MALDI-MS、ESI-MS、FAB-MSなどのイオン化法と質量分析計(例:二重収束質量分析計、四重極型分析計、飛行時間型質量分析計、フーリエ変換質量分析計、イオンサイクロトロン質量分析計など)を組み合わせる方法により、試験化合物に相当するピークの出現を検出することによっても、阻害物質結合型ポリペプチドと試験化合物との結合を測定することができるが、これらの方法に限定されず、いかなる公知の他の方法も利用可能である。

[0094] 試験化合物が、阻害物質結合型ポリペプチドにおけるTLR4細胞内領域内の標的結合部位に結合することの確認は、阻害物質結合型ポリペプチドの代わりに阻害物質非結合型ポリペプチドを用いて、上記と同様にして試験化合物の結合活性を測定することにより行うことができる。

その結果、阻害物質結合型ポリペプチドに結合するが、阻害物質非結合型ポリペ

プチドには結合しない物質を、TLR$_4$細胞内領域内の標的結合部位に結合する化合物として選択することができる。

[0095] 試験化合物のTLR$_4$シグナル伝達阻害活性の測定は、試験化合物の存在下および非存在下における、TLR$_4$を発現する細胞のTLR$_4$シグナル伝達を調べることにより行うことができる。具体的には、TNFα、IL－1、IL－6などの炎症性サイトカインの発現や、IFN－α、IFN－βもしくはインターフェロン誘導性遺伝子の発現変動を、ノーザンブロットやRT－PCRなどのRNAレベルで測定するか、あるいは各遺伝子産物の抗体を用いて蛋白質レベルで測定するかにより調べることができる。TLR$_4$を発現する細胞としては、内在のTLR$_4$を発現している哺乳動物細胞、もしくはTLR$_4$もしくはその部分ペプチドの製造において上記した、TLR$_4$もしくはその部分ペプチドをコードするDNAを導入した形質転換細胞（一過的発現を含む）、好ましくは哺乳動物細胞、より好ましくはヒト細胞が挙げられる。

例えば、試験化合物の存在下で上記遺伝子の発現量が20%以上減少した場合に、当該試験化合物を、TLR$_4$シグナル伝達阻害物質として選択することができる。

[0096] TLR$_4$シグナルによる炎症性サイトカインの発現誘導は、NF－κBの活性化を介して該転写因子に特異的なシスエレメントをプロモーター領域に有する炎症性サイトカイン遺伝子の転写が活性化されることにより起こる。また、TLR$_4$シグナルによるIFN－βやインターフェロン誘導性遺伝子の発現誘導は、IRF$_3$の活性化を介して該転写因子に特異的なシスエレメントをプロモーター領域に有するIFN－βやインターフェロン誘導性遺伝子の転写が活性化されることにより起こる。したがって、より好ましい実施態様においては、試験化合物のTLR$_4$シグナル伝達阻害活性の測定は、阻害物質結合型ポリペプチドを発現し、且つNF－κBもしくはIRF$_3$結合配列を含むプロモーターの制御下にある遺伝子、好ましくはレポーター遺伝子を含む細胞を、試験化合物の存在下および非存在下で一定時間培養した後、当該遺伝子の発現量を測定することにより行うことができる。

[0097] 阻害物質結合型ポリペプチドを発現する細胞としては、上記したと同様のものが挙げられる。TLR$_4$シグナルはTLR$_4$リガンドであるLPSによって活性化されるので、使用される阻害物質結合型ポリペプチドは、LPS刺激に応答し得るように、TLR$_4$の細

胞外領域内のLPS結合領域を含んでいることが好ましい。また、該ポリペプチドが正しく膜に結合し得るように、該ポリペプチドは膜貫通領域と、細胞に適合したシグナルペプチドを含んでいることが望ましい。NF－ B結合配列としては、GGGRNNYYCC（配列番号：3）が、IRF3結合配列としてはGIV仏SSGIV仏NY（配列番号：4）がそれぞれ挙げられるが、該転写因子の発現制御を受けることが知られている遺伝子のプロモーター領域における、それらの結合する配列であれば、上記コンセンサス配列以外のものであってもよい。使用するプロモーターとしては、用いる宿主細胞内で機能的なものであれば特に制限はなく、宿主細胞に応じて上記したいずれかのプロモーターがそれぞれ例示される。宿主細胞として動物細胞を用いる場合は、使用するプロモーターは、使用するNF－ B結合配列もしくはIRF3結合配列の由来するプロモーターであってよい。レポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ遺伝子、GFP遺伝子、EGFP遺伝子、ペルオキシダーゼ遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子などが挙げられるが、それらに限定されない。NF－ BもしくはIRF3結合配列を含むプロモーターの制御下にある遺伝子は、宿主細胞に応じて上記したベクターのいずれかに挿入し、上記した適当な遺伝子導入法を用いて宿主細胞に導入することができる。

[0098] 上記細胞の培養は、宿主細胞に応じて、上記した各種培地もしくはリン酸緩衝生理食塩水などの中で、上記と同様の方法で行うことができる。培地もしくは緩衝液中には、試験化合物の他、阻害結合型ポリペプチドがリガンド結合領域を含む場合には、LPSを添加してTLR4シグナルのベースライン（試験化合物非存在下でのレポーター遺伝子の発現量）を高くすることができる。培養終了後、レポーター遺伝子の発現量を測定する。当該測定方法は、各レポーター遺伝子について自体公知の方法がそれぞれ使用され得る。

例えば、試験化合物の存在下でレポーター遺伝子の発現量が20%以上減少した場合に、当該試験化合物を、TLR4シグナル伝達阻害物質として選択することができる。

[0099] 本発明のスクリーニング方法の特に好ましい態様においては、阻害物質結合型ポリペプチドを発現する細胞（サンプル1）と、目的とするTLR4シグナル阻害物質の結合

部位を変異させた阻害物質非結合型ポリペプチドを発現する細胞（サンプル2）とをそれぞれ用いて、上記レポーターアッセイを実施することにより、試験化合物の標的結合部位への結合の有無と、試験化合物のTLR4シグナル伝達阻害活性とを一括して測定することができる。即ち、サンプル2では、標的部位に結合するTLR4シグナル阻害物質は阻害物質非結合型ポリペプチドに結合しないので、TLR4シグナルを阻害せず、レポーター遺伝子の発現量の減少はみられない。したがって、当該方法によれば、試験化合物非存在下で細胞を培養し、レポーター遺伝子の発現量を測定する必要がない。

例えば、サンプル1におけるレポーター遺伝子の発現量がサンプル2における発現量に比べて20%以上減少した場合に、試験化合物を、TLR4シグナル伝達阻害物質として選択することができる。

[0100] 従って、本発明はまた、上記の阻害物質結合型ポリペプチドを発現する細胞と、目的とするTLR4シグナル阻害物質の結合部位を変異させた阻害物質非結合型ポリペプチドを発現する細胞とを構成として含む、TLR4シグナル伝達阻害物質のスクリーニング用キットを提供する。当該キットは、細胞の培養のための培地や容器、レポーター遺伝子の発現の検出用試薬等をさらに構成として含んでもよい。

[0101] 本発明のスクリーニングで得られる、TLR4の細胞内領域に結合し、TLR4のシグナル伝達を阻害する物質（以下、本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質と略記する）は、例えば、哺乳動物(例、ラット、マウス、モルモット、サル、ウシ、イヌ、ブタ、ヒト等)に対する一酸化窒素(NO)産生抑制剤、TNF－α、IL－1、IL－6などの炎症性サイトカイン産生抑制剤、TLRシグナル阻害剤（特に、TLR4シグナル阻害剤）などとして有用である。

また、本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質は、例えば、哺乳動物(例、ラット、マウス、モルモット、サル、ウシ、イヌ、ブタ、ヒト等)に対する重症セプシスを含むセプシス、心疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、中枢神経系疾患、感染性疾患、セプティックショック、免疫機能低下症などの疾患、例えば、敗血症、エンドトキシンショック、エキソトキシンショック、全身性炎症反応症候群(SIRS)、代償性抗炎症反応症候群(CARS)、熱傷、外傷、手術後合併症、心不全、ショック、低血圧、リウマチ関節炎、骨

関節炎、胃炎、潰瘍性大腸炎、消化性潰瘍、ストレス性胃潰瘍、クローン病、自己免疫疾患、臓器移植後の組織障害および拒絶反応、虚血再潅流障害、急性冠微小血管塞栓、ショック性血管塞栓(播種性血管内血液凝固(DIC)など)、虚血性脳障害、動脈硬化、悪性貧血、ファンコニー貧血症、鎌形赤血球性貧血病、膵炎、ネフローゼ症候群、腎炎、腎不全、インシュリン依存性糖尿病、インシュリン非依存性糖尿病、肝性ポルフィリン症、アルコール中毒、パーキンソン病、慢性白血病、急性白血病、腫瘍、骨髄腫、幼児および成人性呼吸窮迫症候群、肺気腫、痴呆、アルツハイマー病、多発性硬化症、ビタミンE欠乏性、老化、サンバーン、筋ジストロフィー、心筋炎、心筋症、心筋梗塞、心筋梗塞後遺症、骨粗鬆症、肺炎、肝炎、乾癬、疼痛、白内障、インフルエンザ感染症、マラリア、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症、放射線障害、火傷、体外受精効率化、高カルシウム血症、硬直性脊椎炎、骨減少症、骨ページェット病、骨軟化症、骨折、急性バクテリア髄膜炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、侵襲性ブドウ状球菌感染症、結核、全身性真菌感染症、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘－帯状疱疹ウイルス感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、急性ウイルス脳炎、脳炎、髄膜炎、感染症に伴う免疫機能低下、喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、逆流性食道炎、発熱、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、痛風、胃アトニー、痔疾、全身性エリテマトーデス、脊髄損傷、不眠症、統合失調症、癒摘、肝硬変、肝不全、不安定狭心症、心弁膜症、透析による血小板減少症または低血圧症、急性虚血性脳卒中、急性期脳血栓症、癌転移、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、大腸癌、胃癌、卵巣癌、前立腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、悪性黒色腫、ホジキン病、非ホジキン性リンパ腫、抗癌剤や免疫抑制剤投与による副作用などの予防・治療剤としても有用である。

さらに、本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質は、例えば、哺乳動物(例、ラット、マウス、モルモット、サル、ウシ、イヌ、ブタ、ヒト等)に対する臓器障害等の予防・治療剤としても有用である。ここでいう臓器とは、中枢神経系、循環器系、呼吸器系、骨・関節系、消化器系または腎・尿路系の各種臓器をいう。より具体的には、本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質は、TLRシグナルの変化に起因する、

(1) 中枢神経系疾患〔(i)神経変性疾患(例、老年期痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、クロイツフェルトヤコブ病、筋萎縮性脊髄側索硬化症、糖尿病性ニューロパシー等)、(ii)脳循環器障害(例、脳梗塞、脳出血、脳動脈硬化に伴う脳循環不全等)時、頭部外傷・脊髄損傷時、脳炎後遺症時または脳性麻痺時の神経障害、(iii)記憶障害(例、老年期痴呆、健忘症等)など〕、特にアルツハイマー病、

(2) 循環器系疾患〔(i)急性心筋梗塞,不安定狭心症等の急性冠動脈症候群、(ii)末梢動脈閉塞症、(iii)冠動脈インターベンション(経皮的冠動脈形成術(PTCA)、アテレクトミー(DCA)、ステント留置等)後の再狭搾、(iv)冠動脈バイパス手術後の再狭窄、(v)その他の末梢動脈におけるインターベンション(血管形成術、アテレクトミー、ステント留置等)及びバイパス手術後の再狭窄、(vi)心筋梗塞、狭心症等の虚血性心疾患、(vii)間歓性跛行、(viii)脳卒中(脳梗塞、脳塞栓、脳出血など)、(ix)ラクネ梗塞、(x)脳血管性痴呆、(xi)動脈硬化症(例えば、アテローム性動脈硬化症など)およびこれらに起因する疾患(例えば、心筋梗塞等の虚血性心疾患および脳梗塞・脳卒中等の脳血管障害など)、(xii)心不全、(xiii)不整脈、(xiv)動脈硬化巣の進展、(xv)血栓形成、(xvi)低血圧症、(xvii)ショック、(xviii)ショック性血管塞栓(播種性血管内血液凝固(DIC)など))、特に動脈硬化症、

(3) 呼吸器系疾患(呼吸窮迫症候群、呼吸不全、肺気腫、肺炎、気管支炎、細気管支炎など)、

(4) 骨・関節系疾患(慢性関節リウマチ、骨粗鬆症、骨軟化症、骨減少症、骨ペーチェット病など〕、特に慢性関節リウマチ、

(5) 消化器・肝胆膵系疾患(潰瘍性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、肝硬変、肝不全、肝炎、胆嚢炎、膵炎など〕、特に潰瘍性大腸炎、

(6) 腎・尿路系疾患(腎炎、腎不全、膀胱炎など)

またはこれらが組み合わさった疾患(多臓器不全など)などの予防・治療剤としても有用である。さらに、本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質は、TLR4シグナルの変化に起因する感染症、特に臓器障害を伴うセプシス(重症セプシス)の予防・治療剤として有用である。

さらに、本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質は、臓器障害、重症セプシスなどの

感染症、アルツハイマー病などの中枢神経系疾患、動脈硬化症などの循環器系疾患、慢性関節リウマチなどの骨・関節系疾患、潰瘍性大腸炎などの消化器系疾患などの予防・治療剤としても有用である。

[0102] 本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質は他の薬物と併用して使用することができる。そのような併用薬としては、例えば、抗菌薬、抗真菌薬、非ステロイド性抗炎症薬、ステロイド薬、抗凝血薬、抗血小板薬、血栓溶解薬、免疫調節薬、抗原虫薬、鎮咳・去たん薬、鎮静薬、麻酔薬、麻薬拮抗薬、抗潰瘍薬、高脂血症治療薬、動脈硬化症治療薬、HDL増加薬、不安定プラーク安定化薬、心筋保護薬、甲状腺機能低下症治療薬、ネフローゼ症候群治療薬、慢性腎不全治療薬、利尿薬、高血圧治療薬、心不全治療薬、筋弛緩薬、抗てんかん薬、強心薬、血管拡張薬、血管収縮薬、不整脈治療薬、糖尿病治療薬、昇圧薬、精神安定薬、抗精神病薬、アルツハイマー病治療薬、抗パーキンソン薬、筋萎縮性脊髄側索硬化症治療薬、神経栄養因子、抗うつ薬、精神分裂病治療薬、抗腫瘍薬、ビタミン薬、ビタミン誘導体、関節炎治療薬、抗リウマチ薬、抗アレルギー薬、抗喘息薬、アトピー性皮膚炎治療薬、アレルギー性鼻炎治療薬、頻尿・尿失禁治療薬、タンパク質分解薬、タンパク質分解酵素阻害薬、抗SIDS薬、抗セプシス薬、抗セプティックショック薬、エンドトキシン拮抗薬あるいは抗体、シグナル伝達阻害薬、炎症性メディエーター作用抑制薬、炎症性メディエーター作用抑制抗体、炎症性メディエーター産生抑制薬、抗炎症性メディエーター作用抑制薬、抗炎症性メディエーター作用抑制抗体、抗炎症性メディエーター産生抑制薬、机アドレナリン作動薬などが挙げられ、なかでも抗菌薬、抗真菌薬、非ステロイド性抗炎症薬、ステロイド薬、抗凝血薬などが好ましい。具体的には以下のものが挙げられる。

[0103] (1)抗菌薬

①サルファ剤

スルファメチゾール、スルフィソキサゾール、スルファモノメトキシン、スルファメチゾール、サラゾスルファピリジン、スルファジアジン銀など。

(ii)キノリン系抗菌薬

ナリジクス酸、ピペミド酸三水和物、エノキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン

、トシル酸トスフロキサシン、塩酸シプロフロキサシン、塩酸ロメフロキサシン、スパルフロキサシン、フレロキサシンなど。

(iii)抗結核薬

イソニアジド、エタンブトール(塩酸エタンブトール)、パラアミノサリチル酸(パラアミノサリチル酸カルシウム)、ピラジナミド、エチオナミド、プロチオナミド、リファンピシン、硫酸ストレプトマイシン、硫酸カナマイシン、サイクロセ児ノなど。

(iv)抗酸菌薬

ジアフェニルスルホン、リファンピシ児ノなど。

(v)抗ウイルス薬

イドクスウリジン、アシクロビル、ビタラビン、ガンシクロビルなど。

(vi)抗HIV薬

ジドブジン、ジダノシン、ザルシタビン、硫酸インジナビルエタノール付加物、リトナビルなど。

(vii)抗スピロヘータ薬

(viii)抗生物質

塩酸テトラサイク児ノ、アンピシ児ノ、ピペラシ児ノ、ゲンタマイシン、ジベカシン、カネンドマイシン、リビドマイシン、トブラマイシン、アミカシン、フラジオマイシン、シソマイシン、テトラサイク児ノ、オキシテトラサイク児ノ、ロリテトラサイク児ノ、ドキシサイク児ノ、ピペラシ児ノ、チカルシ児ノ、セファロチン、セファピリン、セファロリジン、セファクロル、セファレキシン、セフロキサジン、セファドロキシル、セファマンドール、セフォトアム、セフロキシム、セフォチアム、セフォチアムヘキセチル、セフロキシムアキセチル、セフジニル、セフジトレンピボキシル、セフタジジム、セフピラミド、セフスロジン、セフメノキシム、セフポドキシムプロキセチル、セフピロム、セファゾプラン、セフェピム、セフスロジン、セフメノキシム、セフメタゾール、セフミノクス、セフォキシチン、セフブペラゾン、ラタモキナセフ、フロモキセフ、セファゾ児ノ、セフォタキシム、セフォペラゾン、セフチゾキシム、モキサラクタム、チエナマイシン、スルファゼシン、アズスレオナムまたはそれらの塩、グリセオフルビン、ランカシジン類(ジャーナル・オブ・アンチバイオティックス(J. Antibiotics), 38, 877 −885(1985))など。

(2) 抗真菌薬

①ポリエチレン系抗生物質(例、アムホテリシンB、ナイスタチン、トリコマイシン)

(ii)グリセオフルビン、ピロールニトリンなど

(iii)シトシン代謝拮抗薬(例、フルシトシン)

(iv)イミダゾール誘導体(例、エコナゾール、クロトリマゾール、硝酸ミコナゾール、ビホナゾール、クロコナゾール)

(v)トリアゾール誘導体(例、フルコナゾール、イトラコナゾール、アゾール系化合物(2−〔(1R,2R)−2−(2,4−ジフルオロフェニル)−2−ヒドロキシ−1−メチル−3−(1H−1,2,4−トリアゾール−1−イル)プロピル)−4−〔4−(2,2,3,3−テトラフルオロプロポキシ)フェニル)−3(2H,4H)−1,2,4−トリアゾロン乃

(vi)チオカルバミン酸誘導体(例、トリナフトール)

(vii)エキノカンジン系誘導体(例、カスポファンジン、ミカファンジン、アニデュラファンジン)など。

(3) 非ステロイド性抗炎症薬

アセトアミノフェン、フェナセチン、エテンザミド、スルピリン、アンチピリン、ミグレニン、アスピリン、メフェナム酸、フルフェナム酸、ジクロフェナックナトリウム、ロキソプロフェンナトリウム、フェニルブタゾン、インドメタシン、イブプロフェン、ケトプロフェン、ナプロキセン、オキサプロジン、フルルビプロフェン、フェンブフェン、プラノプロフェン、フロクタフェニン、エピリゾール、塩酸チアラミド、ザルトプロフェン、メシル酸ガベキサート、メシル酸カモスタット、ウリナスタチン、コルヒチン、プロベネジド、スルフィンピラゾン、ベンズブロマロン、アロプリノール、金チオ児ンゴ酸ナトリウム、ヒアルロン酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウム、塩酸モルヒネ、サリチル酸、アトロピン、スコポラミン、モルヒネ、ペチジン、レボルファイノール、ケトプロフェン、ナプロキセン、オキシモルフォンまたはその塩など。

(4) ステロイド薬

デキサメサゾン、ヘキセストロール、メチマゾール、ベタメサゾン、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、フルオシノニド、フルオシノロンアセトニド、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、酢酸コルチゾン、ヒドロコルチゾン、フルオロメトロン、プロピオン

酸ベクロメタゾン、エストリオールなど。

(5) 抗凝血薬

ヘパ児ンナトリウム、クエン酸ナトリウム、活性化プロテインC、組織因子経路阻害剤、アンチトロンビンIII、ダルテパ児ンナトリウム、ワルファ児ンカリウム、アルガトロバン、ガベキサート、クエン酸ナトリウムなど。

[0104] (6) 抗血小板薬

オザクレルナトリクム、イコサペンタ酸エチル、ベラプロストナトリクム、アルプロスタジル、塩酸チクロピジン、ペントキシフィ児ン、ジピリダモールなど。

(7) 血栓溶解薬

チソキナーゼ、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼなど。

(8) 免疫調節薬

シクロスポ児ン、タクロリムス、グスペリムス、アザチオプリン、抗児ンパ血清、乾燥スルホ化免疫グロブ児ン、エリスロポイエチン、コロニー刺激因子、インターロイキン、インターフェロンなど。

(9) 抗原虫薬

メトロニダゾール、チニダゾール、クエン酸ジエチルカルバマジン、塩酸キニーネ、硫酸キニーネなど。

(10) 鎮咳・去たん薬

塩酸エフェドリン、塩酸ノスカピン、リン酸コデイン、リン酸ジヒドロコデイン、塩酸イソプロテレノール、塩酸メチルエフェド児ン、塩酸ノスカピン、アロクラマイド、クロルフェジアノール、ピコペリダミン、クロペラスチン、プロトキロール、イソプロテレノール、サルブタモール、テレプタ児ン、オキシペテバノール、塩酸モルヒネ、臭化水素酸デキストロペトルファン、塩酸オキシコドン、リン酸ジモルファン、ヒベンズ酸チペピジン、クエン酸ペントキシベ児ン、塩酸クロフェダノール、ベンゾナテート、グアイフェネシン、塩酸ブロムヘキシン、塩酸アンブロキソール、アセチルシステイン、塩酸エチルシステイン、カルボシステインなど。

(11) 鎮静薬

塩酸クロルプロマジン、硫酸アトロピン、フェノバルビタール、バルビタール、アモバ

ルビタール、ペントバルビタール、チオペンタールナトリウム、チアミラールナトリウム、ニトラゼパム、エスタゾラム、フルラザパム、ハロキサゾラム、トリアゾラム、フルニトラゼパム、ブロムワレリル尿素、抱水クロラール、トリクロホスナトリウムなど。

(12)麻酔薬

(12−1)局所麻酔薬

塩酸コカイン、塩酸プロカイン、リドカイン、塩酸ジブカイン、塩酸テトラカイン、塩酸メピバカイン、塩酸ブピバカイン、塩酸オキシブプロカイン、アミノ安息香酸エチル、オキセサゼインなど。

(12−2)全身麻酔薬

①吸入麻酔薬(例、エーテル、ハロタン、亜酸化窒素、インフルラン、エンフルラン)、

(O静脈麻酔薬(例、塩酸ケタミン、ドロペリドール、チオペンタールナトリウム、チアミラールナトリウム、ペントバルビタール)など。

(13)麻薬拮抗薬

レバロルファン、ナロルフィン、ナロキソンまたはその塩など。

(14)抗潰瘍薬

メタクロプロミド、塩酸ヒスチジン、ランソプラゾール、メトクロプラミド、ピレンゼピン、シメチジン、ラニチジン、ファモチジン、ウロガストリン、オキセサゼイン、プログルミド、オメプラゾール、スクラルファート、スルピリド、セトラキサート、ゲファルナート、アルジオキサ、テプレノン、プロスタグランジンなど。

[0105] (15)高脂血症治療薬

HMG−CoA還元酵素阻害薬(例、フルバスタチン、セリバスタチン、アトルバスタチンなど)、フィブラート系薬剤(例、シンフィブラート、クロフィブラートアルミニウム、クリノフィブラート、フェノフィブラートなど)、胆汁酸吸着薬(例、コレスチラミンなど)、ニコチン酸製剤(例、ニコモール、ニセリトロール、ニコチン酸トコフェロールなど)、プロブコール及びその誘導体、多価不飽和脂肪酸誘導体(例、イコサペント酸エチル、ポリエンフォスファチジルコリン、メリナミドなど)、植物ステロール(例、ガンマーオリザノール、ソイステロールなど)、エラスターゼ、デキストラン硫酸ナトリウム、スクワレン合成酵素阻害薬、スクワレンエポキシダーゼ阻害薬、CETP 阻害薬、2−クロロ−3−〔4−(2−

メチル－2－フェニルプロポキシ)フェニル]プロピオン酸エチル(ケミカル・アンドファーマシューティカル・ブレティン(Chem. Pharm. Bull), 38, 2792－2796(1990))、LDL受容体増加薬、コレステロール吸収阻害薬(Ezetimibeなど)、MTP阻害薬、回腸胆汁酸トランスポーター阻害薬、SCAPリガンド、FXRリガンドなど。

(16)動脈硬化症治療薬

MMP阻害薬、キマーゼ阻害薬、ACAT阻害薬(Avasimibe、Enucimibeなど)、アポA I Milanoとその類似物質、スカベンジャー受容体阻害薬、15－リポキシゲナーゼ阻害薬、ホスホリパーゼA2阻害薬、ABCA1活性化薬、LXRリガンド、スフィンゴミエリナーゼ阻害薬、パラオキソナーゼ活性化薬、エストロジェン受容体作動薬など。

(17)HDL増加薬

スクワレン合成酵素阻害薬、CETP阻害薬、LPL活性化薬など。

(18)不安定プラーク安定化薬

MMP阻害薬、キマーゼ阻害薬、ACAT阻害薬、リピド・リッチ・プラーク退縮剤など。

(19)心筋保護薬

心臓ATP－K用口薬、エンドセリン拮抗薬、ウロテンシン拮抗薬など。

(20)甲状腺機能低下症治療薬

乾燥甲状腺(チレオイド)、レボチロキシンナトリウム(チラージンS)、リオチロニジンナトリウム(サイロニン、チロミン)など。

(21)ネフローゼ症候群治療薬

プレドニゾロン(プレドニン)、コハク酸プレドニゾロンナトリウム(プレドニン)、コハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム(ソル・メドロール)、ベタメタゾン(リンデロン)など。

(22) 慢性腎不全治療薬

利尿薬(例、フロセミド(ラシックス)、ブメタニド(ルネトロン)、アゾセミド(ダイアート))、降圧薬(例、ACE阻害薬、マレイン酸エナラプリル(レニベース)、Ca拮抗薬(マニジピン)、α受容体遮断薬、AII拮抗薬(カンデサルタン))など。

(23) 利尿薬

サイアザイド系利尿薬(ベンチルヒドロクロロチアジド、シクロペンチアジド、エチアジ

ド、ヒドロクロロチアジド、ヒドロフルメチアジド、メチクロチアジド、ペンフルチアジド、ポリチアジド、トリクロルメチアジドなど)、ループ利尿薬(クロルタリドン、クロフェナミド、インダパミド、メフルシド、メチクラン、ソトラゾン、トリパミド、キネタゾン、メトラゾン、フロセミドなど)、カリウム保持性利尿薬(スピロノラクトン、トリアムテレンなど)。

[0106] (24)高血圧治療薬

①交感神経抑制薬

α_2刺激薬(例、クロニジン、グアナベンズ、グアンファシン、メチルドパなど)、神経節遮断薬(例、ヘキサメトニウム、トリメタファンなど)、シナプス前遮断剤(例、アルサーオキシロン、ジメチルアミノレセルピナート、レシナミン、レセルピン、シロシンゴピンなど)、ニューロン遮断薬(例、ベタニジン、グアネチジンなど)、α_1遮断薬(例、ブナゾシン、ドキサゾシン、プラゾシン、テラゾシン、ウラピジルなど)、β遮断薬(例、プルプラノロール、ナドロール、チモロール、ニプラジロール、ブニトロロール、インデノロール、ペンブトロール、カルテオロール、カルベジロール、ピンドロール、アセブトロール、アテノロール、ビソプロロール、メトプロロール、ラベタロール、アモスラロール、アロチノロールなど)など。

(ii)血管拡張薬

カルシウムチャンネル拮抗薬(例、マニジピン、ニカルジピン、ニルバジピン、ニソルジピン、ニトレンジピン、ベニジピン、アムロジピン、アラニジピンなど)、フタラジン誘導体(例、ブトララジン、カドララジン、エカラジン、ヒドララジン、トドララジンなど)など。

(iii)ACE阻害薬

アラセプリル、カプトプリル、シラザプリル、デラプリル、エナラプリル、リジノプリル、テモカプリル、トランドラプリル、キナプリル、イミダプリル、ベナゼプリル、ベリンドプリルなど。

(iv)AII拮抗薬

ロサルタン、カンデサルタン、バルサルタン、テルミサルタン、イルベサルタン、フォラサルタンなど。

(v)利尿薬(例えば前述の利尿薬など)

(25) 心不全治療薬

強心薬(例、ジギトキシン、ジゴキシン、メチルジゴキシン、ラナトシドC、プロスシラリジンなど)、α、ほ刺激薬(例、エピネフ児ノ、ノルエピネフ児ノ、イソプロテレノール、ドパミン、ドカルパミン、ドブタミン、デノパミンなど)、ホスホジエステラーゼ阻害薬(例、アムリノン、ミルリノン、塩酸オルプリノンなど)カルシウムチャンネル感受性増強薬(例、ピモベンタンなど)、硝酸薬(例、ニトログリセ児ノ、硝酸イソソルビドなど)、ACE阻害薬(例えば前述のACE阻害薬など)、利尿薬(例えば前述の利尿薬など)、カルペリチド、ユビデカレノン、ベスナリノン、アミノフィリンなど。

(26) 筋弛緩薬

プリジノール、ツボクラ児ノ、パンクロニウム、塩酸トルペリゾン、カルバミン酸クロルフェネシン、バクロフェン、クロルメザノン、メフェネシン、クロゾキサゾン、エペリゾン、チザニジンなど。

(27)抗てんかん薬

フェニトイン、エトサクシミド、アセタゾラミド、クロルジアゼポキシド、トリペタジオン、カルバマゼピン、フェノバルビタール、プリミドン、スルチアム、バルプロ酸ナトリウム、クロナゼパム、ジアゼパム、ニトラゼパムなど。

(28) 強心薬

トランスバイオキソカンファー、テレフィロール、アミノフィリン、エチレフ児ノ、ドパミン、ドブタミン、デノパミン、アミノフィリン、ベシナ児ノ、アムリノン、ピモベンダン、ユビデカレノン、ジギトキシン、ジゴキシン、メチルジゴキシン、ラナトシドC、G－ストロファンチンなど。

(29) 血管拡張薬

オキシフェドリン、ジルチアゼム、トラゾ児ノ、ヘキソベンジン、バメタン、クロニジン、メチルドパ、グアナベンズなど。

(30)血管収縮薬

ドパミン、ドブタミン、デノパミンなど。

(31)不整脈治療薬

はナトリウムチャンネル遮断薬(例、キニジン、プロカインアミド、ジソピラミド、アジマリン、シベンゾ児ノ、リドカイン、ジフェニルヒダントイン、メキシレチン、プロパフェノン、フ

レカイニド、ピルジカイニド、フェニトインなど）、

(ii)β遮断薬（例、プロプラノロール、アルプレノロール、ブフェトロール、オクスプレノロール、アテノール、アセブトロール、メトプロロール、ビソプロロール、ピンドロール、カルテオロール、アロチロールなど）、

(iii)カリウムチャンネル遮断薬（例、アミオダロンなど）、

(iv)カルシウムチェンネル遮断薬（例、ベラパミル、ジルチアゼムなど）など。

(32) 昇圧薬

ドパミン、ドブタミン、デノパミン、ジギトキシン、ジゴキシン、メチルジゴキシン、ラナトシドC、G－ストロファンチンなど。

(33) 糖尿病治療薬

スルホニル尿素剤（例、トルブタミド、クロルプロパミド、グリクロピラミド、アセトヘキサミド、トラザミド、グリベンクラミド、グリブゾールなど）、ビグアナイド剤（例、塩酸メトホルミン、塩酸ブホルミンなど）、α－グルコシダーゼ阻害薬（例、ボグリボース、アカルボースなど）、インスリン抵抗性改善薬（例、ピオグリタゾン、ロジグリタゾン、トログリタゾンなど）、インスリン、グルカゴン、糖尿病性合併症治療薬（例、エパルレスタットなど）など。

[0107] (34)精神安定薬

ジアゼパム、ロラゼパム、オキサゼパム、クロルジアゼポキシド、メダゼパム、オキサゾラム、クロキサゾラム、クロチアゼパム、ブロマゼパム、エチゾラム、フルジアゼパム、ヒドロキシジンなど。

(35) 抗精神病薬

塩酸クロルプロマジン、プロクロルペラジン、トリフロペラジン、塩酸チオリダジン、マレイン酸ペルフェナジン、エナント酸フルフェナジン、マレイン酸プロクロルペラジン、マレイン酸レボメプロマジン、塩酸プロメタジン、ハロペリドール、ブロムペリドール、スピペロン、レセルピン、塩酸クロカプラミン、スルピリド、ゾテピンなど。

(36) アルツハイマー病治療薬

①ドネペジル、リバスチグミン、ガランタミン、TAK－147等のコリンエステラーゼ阻害剤、

(Oイデベノン、メマンチン、ビンポセチン等の脳機能賦活薬など。

(37)抗パーキンソン薬

L－ドーパ、デプレニル、カルビドパ＋レボドパ、ペルゴライド、ロピニロール、カベルゴ児ノ、プラミペキソール、エンタカプロン、ラザベミドなど。

(38) 筋萎縮性脊髄側索硬イロ症治療薬

リルゾール、メカセルミン、ガバペンチンなど。

(39)抗うつ薬

イミプラミン、クロミプラミン、ノキシプチ児ノ、フェネルジン、塩酸アミトリプチ児ノ、塩酸ノルトリプチ児ノ、アモキサピン、塩酸ミアンセ児ノ、塩酸マプロチ児ノ、スルピリド、マレイン酸フルボキサミン、塩酸トラゾドンなど。

(40)精神分裂病治療薬

オランザピン、リスペリドン、クエチアピン、イロペリドンなど。

(41)抗腫瘍薬

6－O－(N－クロロアセチルカルバモイル)フマギロール、ブレオマイシン、メトトレキサート、アクチノマイシンD、マイトマイシンC、ダウノルビシン、アドリアマイシン、ネオカルチノスタチン、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、テトラヒドロフリル－5－フルオロウラシル、ピシバニール、レンチナン、レバミゾール、ベスタチン、アジメキソン、グリチルリチン、塩酸ドキソルビシン、塩酸アクラルビシン、塩酸ブレオマイシン、硫酸ヘプロマイシン、硫酸ビンクリスチン、硫酸ビンブラスチン、塩酸イリノテカン、シクロフォスファミド、メルファラン、ズスルファン、チオテパ、塩酸プロカルバジン、シスプラチン、アザチオプリン、メルカプトプリン、テガフール、カルモフール、シタラビン、メチルテストステロン、プロピオン酸テストステロン、エナント酸テストステロン、メピチオスタン、ホスフェストロール、酢酸クロルマジノン、酢酸リュープリン、酢酸ブセレ児ノなど。

(42) ビタミン薬

①ビタミンA類：ビタミンA_1、ビタミンA_2およびパルミチン酸レチノール

(ii)ビタミンD類：ビタミンD_1、D_2、D_3、D_4およびD_5

(iii)ビタミンE類：cc－トコフェロール、ほ－トコフェロール、γ－トコフェロール、δ－ト

コフェロール、ニコチン酸dl－ cc －トコフェロール

(iv)ビタミンK類：ビタミンK_1、K_2、K_3およびK_4

(v)葉酸(ビタミンM)

(vi)ビタミンB類：ビタミンB_1、ビタミンB_2、ビタミンB_3、ビタミンB_5、ビタミンB_6およびビタミンB_{12}

(vii)ビオチン(ビタミンH)など。

(43)ビタミン誘導体

ビタミンの各種誘導体、例えば、アスコルビン酸、5 ,6－トランス－コレカルシフェロール、2 ,5－ヒドロキシコレカルシフェロール、1－ cc －ヒドロキシコレカルシフェロールなどのビタミンD_3誘導体、5 ,6－トランス－エルゴカルシフェロール等のビタミンD_2誘導体など。

[0108] (44)抗アレルギー薬

ジフェンヒドラミン、クロルフェニラミン、トリペレナミン、メトジラミン、クレミゾール、ジフェニルピラ児ノ、メトキシフェナミン、クロモグリク酸ナトリウム、トラニラスト、レビリナスト、アンレキサノクス、イブジラスト、ケトチフェン、テルフェナジン、メキタジン、アセラスチン、エピナスチン、塩酸オザグレル、プランルカスト水和物、セラトロダストなど。

(45)抗喘息薬

塩酸イソプレナ児ノ、硫酸サルブタモール、塩酸プロカテロール、硫酸テルブタ児ノ、塩酸トリメトキノール、塩酸ツロブテロール、硫酸オルシプレナリン、臭イロ水素酸フェノテロール、塩酸エフェドリン、臭イビイプロトロピウム、臭イビオキシトロピウム、臭イビフルトロピウム、テオフィ児ノ、アミノフィ児ノ、クロモグリク酸ナトリウム、トラニラスト、レビリナスト、アンレキサノン、イブジラスト、ケトチフェン、テルフェナジン、メキタジン、アゼラスチン、エピナスチン、塩酸オザグレル、プランルカスト水和物、セラトロダスト、デキサメタゾン、プレドニゾロン、ヒドロコルチゾン、プロピオン酸ベクロペタゾンなど。

(46)アトピー注皮膚炎治療薬

クロモグリク酸ナトリウムなど。

(47)アレルギー性鼻炎治療薬

クロモグリク酸ナトリウム、マレイン酸クロルフェニラミン、酒石酸アリメマジン、フマル

酸クレマスチン、塩酸ホモクロルシクリジン、テルフェナジン、メキタジンなど。

(48) 頻尿・尿失禁治療薬

塩酸フラボキサートなど。

(49) 抗セプシス薬

rBPI−21(バクテリシダルパーミアビリティ インクリージング プロテイン)、BI−51017(アンチトロンビンIII)、SC−59735(TFPI)、r−PAFアセチルヒドラーゼ、LY−203638 (ｒｷ注ｲﾋプロテインC)、抗TNF−α抗体、抗CD14抗体、C舛oFab、アルカリフォスファターゼ(LPS不活性ｲﾛ剤)等のペプチドｲ注ｲﾛ合物、JTE−607、E−5531、E−5564、S−5920、FR−167653、ONO−1714、ONO−5046(sivelestat)、GW−273629、RWJ−67657、GR−270773、NOX−100、GR−270773、NOX−100、等の非ペプチドｲ注ｲﾛ合物など。

(50) 制吐剤

フェノリアジン誘導体、5−HT3受容体アンタゴニストなど。

(51) メトヘモグロビン上昇防止剤

メチレンブルー、アスコルビン酸など。

(52) その他

ヒドロキシカム、ダイアセリン、メゲストロール酢酸、ニセロゴリン、プロスタグランジン類など。

[0109] 本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質と他の薬物とを併用した場合、次のような効果を有する。

(1) 本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質や併用薬物を単独投与した場合よりも、これらの投与量を軽減することができる。

(2) 相乗的な治療効果が得られる。

(3) 菌感染などの疾患に伴い発症する種々の疾患に対して、広く治療効果を発揮する。

(4) 本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質の副作用を軽減できる。

併用に際しては、本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質と併用薬物の投与時期は限定されず、本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質またはその医薬組成物と併用薬物またはその医薬組成物とを、投与対象に対し、同時に投与してもよいし、時間

差をおいて投与してもよい。併用薬物の投与量は、臨床上用いられている投与量に準ずればよく、投与対象、投与ルート、疾患、組み合わせ等により適宜選択することができる。

併用の投与形態は、特に限定されず、投与時に、本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質と併用薬物とが組み合わされていればよい。このような投与形態としては、例えば、(1)本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質またはその医薬組成物と併用薬物とを同時に製剤化して得られる単一の製剤の投与、(2)本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質またはその医薬組成物と併用薬物またはその医薬組成物とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の同一投与経路での同時投与、(3)本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質またはその医薬組成物と併用薬物またはその医薬組成物とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の同一投与経路での時間差をおいての投与、(4)本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質またはその医薬組成物と併用薬物またはその医薬組成物とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の異なる投与経路での同時投与、(5)本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質またはその医薬組成物と併用薬物またはその医薬組成物とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の異なる投与経路での時間差をおいての投与(例えば、本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質またはその医薬組成物;併用薬物またはその医薬組成物の順序での投与、あるいは逆の順序での投与)などが挙げられる。

[0110] 本発明の併用剤における本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質と併用薬物との配合比は、投与対象、投与ルート、疾患等により適宜選択することができる。

例えば、本発明の併用剤におけるシクロアルケン化合物または化合物Aの含有量は、製剤の形態によって相違するが、通常製剤全体に対して約0.01ないし99.8重量%、好ましくは約0.1ないし50重量%、さらに好ましくは約0.5ないし20重量%程度である。

本発明の併用剤における併用薬物の含有量は、製剤の形態によって相違するが、通常製剤全体に対して約0.01ないし99.8重量%、好ましくは約0.1ないし50重量%、さらに好ましくは約0.5ないし20重量%程度である。

本発明の併用剤における担体等の添加剤の含有量は、製剤の形態によって相違

するが、通常製剤全体に対して約1ないし99.98重量%、好ましくは約10ないし90重量%程度である。

また、本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質をそれぞれ別々に製剤化する場合も同様の含有量でよい。

[0111] 本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質をヒトに投与する場合、それ自体あるいは適宜の薬理学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤などと混合し、経口投与剤(例、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤など)、非経口投与剤(例、注射剤、外用剤(例、経鼻投与製剤、経皮投与製剤など)、坐剤(例、直腸坐剤、膣坐剤など)などの医薬組成物として経口的または非経口的に安全に投与することができる。

これらの製剤は、例えば、製剤の製造において通常一般に用いられる自体公知の方法を適用することにより製造することができる。製剤中の本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質の配合割合は、その形態によっても異なるが、例えば前記した経口投与剤においては約10ないし約95重量%が好ましく、例えば前記した非経口投与剤では約0.001ないし約95重量%が好ましい。

[0112] 例えば注射剤は、本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質を可溶化剤(例、β-シクロデキストリン類など)、分散剤(例、ツイーン(Tween)80(アトラスパウダー社製、米国)、HCO60(日光ケミカルズ製)、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウムなど)、保存剤(例、メチルパラベン、プロピルパラベン、ベンジルアルコール、クロロブタノールなど)、等張化剤(例、塩化ナトリウム、グリセリン、ソルビトール、ブドウ糖など)などとともに常法に従って水性注射剤にすることもでき、あるいは植物油(例、オリーブ油、ゴマ油、ラッカセイ油、綿実油、コーン油など)、プロピレングリコールなどに、適宜溶解、懸濁あるいは乳化して油性注射剤に成形することもできる。

経口投与製剤は、本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質に、例えば、賦形剤(例、乳糖、白糖、デンプンなど)、崩壊剤(例、デンプン、炭酸カルシウムなど)、結合剤(例、デンプン、アラビアゴム、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロースなど)または滑沢剤(例、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール6000など)などを適宜添加して圧縮成形し、次いで必要に応じて、味のマスキング、腸溶性あるいは持続性の目的のための自体公知の方法での

コーティングなどを施すことにより製造することもできる。コーティング剤としては、例えばヒドロキシプロピルメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリオキシエチレングリコール、ツイーン80、プルロニックF68、セルロースアセテートフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ヒドロキシメチルセルロースアセテートサクシネート、オイドラギッド(ローム社製、西ドイツ、メタアクリル酸、アクリル酸共重合)、色素(例、酸化チタン、ベンガラなど)などが適宜用いられる。

[0113] 本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質は、固状、半固状あるいは液状の外用剤としても用いることができる。

例えば、固状の外用剤は、本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質をそのまま、あるいは賦形剤(例、グリコール、マンニトール、デンプン、微結品セルロースなど)、増粘剤(例、天然ガム類、セルロース誘導体、アクリル酸重合体など)などを添加、混合し、粉状の組成物とすることにより製造されることもできる。半固状の外用剤は、常法に従って製造し、水性または油性のゲル剤、あるいは軟膏剤として用いることが好ましい。液状の外用剤は、注射剤の製造に用いる手段あるいはそれに準じた手段により、油性あるいは水性の懸濁剤とすることにより製造されることもできる。

また、固状、半固状または液状の外用剤に、pH調節剤(例、炭酸、リン酸、クエン酸、塩酸、水酸化ナトリウムなど)、防腐剤(例、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、塩化ベンザルコニウムなど)などを適宜加えてもよい。具体的には、例えばワセリン、ラノリンなどを基剤として、1gあたり本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質を通常約0.1乃至約100mg含有する軟膏剤として、用いることもできる。

本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質は、油性または水性の固状、半固状あるいは液状の坐剤とすることもできる。坐剤を製造する際の油性基剤としては、例えば高級脂肪酸のグリセライド(例、カカオ脂、ウィテップゾール類(ダイナマイトノーベル社製)など)、中級脂肪酸(例、ミグリオール酸(ダイナマイトノーベル社製)など)、あるいは植物油(例、ゴマ油、大豆油、綿実油など)などが適宜用いられる。また水性基剤としては、例えばポリエチレングリコール類、プロピレングリコールなどが用いられ、水性ゲル基剤としては、例えば天然ガム類、セルロース誘導体、ビニール重合体、アクリ

ル酸重合体などが適宜用いられる。

[0114] 本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質の投与量は、年齢、体重、症状、剤形、投与方法、投与期間などにより異なるが、例えば、セプシス治療を目的として患者(成人、体重約60kg)一人あたり、通常、本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質として1日約0.01ないし約1000mg／kg、好ましくは約0.01ないし約100mg／kg、より好ましくは約0.1ないし約100mg／kg、とりわけ約0.1ないし約50mg／kgを、なかでも約1.5ないし約30mg／kgを1日1回から数回に分けて経口または非経口投与される。もちろん、前記したように投与量は種々の条件で変動するので、前記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また範囲を超えて投与する必要のある場合もある。

本発明の併用剤の投与量は、化合物の種類、年齢、体重、症状、剤形、投与方法、投与期間などにより異なるが、例えば、セプシス治療を目的として患者(成人、体重約60kg)一人あたり、通常、本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質および併用薬物として、それぞれ1日約0.01ないし約1000mg／kg、好ましくは約0.01ないし約100mg／kg、より好ましくは約0.1ないし約100mg／kg、とりわけ約0.1ないし約50mg／kgを、なかでも約1.5ないし約30mg／kgを1日1回から数回に分けて静脈投与される。もちろん、前記したように投与量は種々の条件で変動するので、前記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また範囲を超えて投与する必要のある場合もある。

併用薬物は、副作用が問題とならない範囲でどのような量を設定することも可能である。併用薬物としての一日投与量は、症状の程度、投与対象の年齢、性別、体重、感受性差、投与の時期、間隔、医薬製剤の性質、調剤、種類、有効成分の種類などによって異なり、特に限定されないが、薬物の量として通常、たとえば経口投与で哺乳動物1kg体重あたり約0.001～2000mg、好ましくは約0.01～500mg、さらに好ましくは、約0.1～100mg程度であり、これを通常1日1～4回に分けて投与する。

本発明の併用剤を投与するに際しては、同時期に投与してもよいが、併用薬物を先に投与した後、本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質を投与してもよいし、本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質を先に投与し、その後で併用薬物を投与してもよい。時間差をおいて投与する場合、時間差は投与する有効成分、剤形、投与方法に

より異なるが、例えば、併用薬物を先に投与する場合、併用薬物を投与した後1分～3日以内、好ましくは10分～1日以内、より好ましくは15分～1時間以内に本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質を投与する方法が挙げられる。本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質を先に投与する場合、本発明のTLR4シグナル伝達阻害物質を投与した後、1分～1日以内、好ましくは10分～6時間以内、より好ましくは15分から1時間以内に併用薬物を投与する方法が挙げられる。

実施例

[0115] 以下、実施例を記載し、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

[0116] 実施例1

定法によりポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法によって各種cDNAの3'-および5'-末端に制限酵素サイトを付加したDNAを増幅した。プライマーは以下のとおり。

TIRAP:

5'-GCGCGGATCCATGGCATCATCGACCTCCCT-3'(配列番号:5)

5'-GCGCGCGGCCGCTCAAA牛GTAGATCAGATA -3'(配列番号:6)

TLR2細胞内TIRドメイン:

5'-GGATCCTATGATGCATTTGTTTCTTACAGT-3'(配列番号:7)

5'-AAGCGGCCGCCTAGGACTTTATCGCAGCTCTCAG-3'(配列番号:8)

TLR4細胞内TIRドメイン:

5'-GGATCCTATGATGCCTTTGTTATCTACTCA-3'(配列番号:9)

5'-AAGCGGCCGCTCAGATAGATGTTGCTTCCTGCCA-3'(配列番号汀0

上記プライマーDNAおよびTAKA l仏 Ex Taqを用い、サーマルサイクラーにて、最初95℃で2分間置いた後、95℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分を1反応サイクルとして30サイクル繰り返し、最後に72℃で10分間伸長反応を行った。増幅したDNA断片をTA Cloning Kit (Invitrogen)を用いてクローニングした。得られたプラスミドベクターを制限酵素処理してアガロースゲルで電気泳動し、Sephaglas BandPrep Kit (Amersham)によりバンド切り出し精製を行った。これをインサートとして、DNA ligation kit Ver.2 (TAKARA)を用いてにベクタープラスミドpGEX-4T-1 (Amersham)に挿入した。

完成したプラスミドで大腸菌を形質転換し、10mLのampicillin含有LB培地中で37℃、18時間培養した。菌液2.4mLを130mLのampicillin含有LB培地に接種、振とう培養しOD$_{600}$が0.9前後になったら1mol/Lのisopropyl-β-D-thiogalactopyranosideを130μL添加し30℃で4時間培養した。培養後、菌体を集め、10mLのLysis Buffer (10mmol/L Tris pH7.5, 150nmol/L NaCl, 0.5% triton-X-100, 1mmol/L PMSF)を添加した。菌体を超音波破砕後、遠心して得られた上清に300μLのGlutathione Sepharose 4B (Amersham)を添加し、4℃で60分穏やかに振とうした。反応後、GST融合蛋白結合ビーズを0.1% Triton X-100添加TBS (Tris buffered saline, 50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl)で洗った。

完成したGST融合蛋白結合ビーズと^{3}H-化合物A(アマシャム社で合成)を4℃で一夜反応させた。反応後、0.1% Triton X-100添加TBSでビーズを洗い、5% 2-mercaptoethanol (ME)含有sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)用sample bufferを加え、100℃で5〜10分間加熱した。遠心し上清をラベル化蛋白サンプルとして分取し、SDS-PAGEで蛋白を分離した。蛋白を分離したゲルを40%メタノール-10%酢酸溶液で固定してからCBB染色し(図1A)、ろ紙上に載せてゲル乾燥機で乾燥させた。乾燥ゲルとイメージングプレートTR2040(富士写真フィルム)を密着させ感光し、BAS-2500(富士写真フィルム)で蛋白に結合した^{3}H量を測定した(オートラジオグラフィー)。^{3}H-化合物AはGST-TLR4細胞内TIRドメイン融合蛋白に選択的に結合し、それ以外のGST融合蛋白やGSTには結合しなかった(図1B)。

[0117] 実施例2

PCR法を用いて定法によりTLR4をコードするcDNAを得て、発現ベクターpEFBosに組み込んだ。各点変異体はStratagene社製のQuikChange II Site-directed Mutagenesis Kitを用いて作製した。プライマーは、キットの説明書にしたがい、両側に変異に相当するミスマッチを導入した。作製したプライマーは下記の通り(変異導入部位を下線で示す)。以後はキットの説明書に従い変異体を作製し、コンピテントセルを形質転換した。シングルコロニーをピックアップし、定法に従いプラスミドを調製後DNA配列を確認し各変異体TLR4を含むプラスミドを得た。

1CA:

5'–TGATGCTTCTTGCTGGCGCCATAAAGTATGGTAGAG–3' (配列番号:11)

5'–CTCTACCATACTTTATGGCGCCAGCAAGAAGCATCA–3' (配列番号:12)

2CA:

5'–CCTCCATTTCAGCTCGCCCTTCACTACAGAGA–3' (配列番号:13)

5'–TCTCTGTAGTGAAGGGCGAGCTGAAATGGAGG–3' (配列番号:14)

3CA:

5'–ATCCAGAGCCGCTGGGCTATCTTTGAATATGA–3' (配列番号:15)

5'–TCATATTCAAAGATAGCCCAGCGGCTCTGGAT–3' (配列番号:16)

4CA:

5'–ACAGTGGGTACAGGAGCCAATTGGCAGGAAGC–3' (配列番号:17)

5'–GCTTCCTGCCAATTGGCTCCTGTACCCACTGT–3' (配列番号:18)

PH:

5'–TACAGAGACTTTATTCACGGTGTGGCCATTGC–3' (配列番号:19)

5'–GCAATGGCCACACCGTGAATAAAGTCTCTGTA–3' (配列番号:20

1KR:

5'–CAGTTCTGGTCTATAGGTTCTATTTTCACCTG–3' (配列番号:21)

5'–CAGGTGAAAATAGAACCTATAGACCAGAACTG–3' (配列番号:22)

2KR:

5'–TGCTGGCTGCATAAGGTATGGTAGAGGTG–3' (配列番号:23)

5'–CACCTCTACCATACCTTATGCAGCCAGCA–3' (配列番号:24)

3KR:

5'–GGAATGAGCTAGTAAGGAATTTAGAAGAAGG–3' (配列番号:25)

5'–CCTTCTTCTAAATTCCTTACTAGCTCATTCC–3' (配列番号:26)

4KR:

5'–CATGAAGGTTTCCATAGAAGCCGAAAGGTGATT–3' (配列番号:27)

5'–AATCACCTTTCGGCTTCTATGGAAACCTTCATG–3' (配列番号:28)

5KR:

5'–CCATAAAAGCCGAAGGGTGATTGTTGTGG–3' (配列番号:29)

5'-CCACAAACAATTCACCCTTCGGCTTTTATGG-3'(配列番号:30)

6KR:

5'-CATTGTCCTGCAGAGGGTGGAGAAGACC-3'(配列番号:31)

5'-GGTCTTCTCCACCCTCTGCAGGACAATG-3'(配列番号:32)

7KR:

5'-CAGAAGGTGGAGAGGACCCTGCTCAGGC-3'(配列番号:33)

5'-GCCTGAGCAGGGTCCTCTCCACCTTCTG-3'(配列番号:34)

8KR:

5'-GAGACGACTCAGAAGAAGCCCTGCTGGATG-3'(配列番号:35)

5'-CATCCAGCAGGGCTCTTCTGAGTCGTCTC-3'(配列番号:36)

9KR:

5'-CCTGCTGGATGGTAGATCATGGAATCCAGA-3'(配列番号:37)

5'-TCTGGATTCCATGATCTACCATCCAGCAGG-3'(配列番号:38)

作製したプラスミドで大腸菌を形質転換させ、Endo Free(R) Plasmid Maxi Kit (Quiagen)を使用して各々500〜700μg程度精製した。アフリカミドリザル腎由来細胞COS-7をOPTI-MEM (Invitrogen)で2回洗い、培地を10%FCS添加、100μg/mL streptomycinおよび100U/mL penicillin含有DMEM (Invitrogen)からOPTI-MEM 5mL/dishに変えた。FLAG-TLR4 WT或いは各変異体をコードするプラスミドをPLUS試薬(Invitrogen)及びLipofectAMINE試薬(Invitrogen)を用いて定法に従いCOS-7細胞にトランスフェクションし、37℃、5%CO_2存在下で3時間培養した。20%FCS添加DMEMを6.5mL/dishとなるよう加え、更に2日間培養した。

培地を1%FCS添加DMEM 5mLに置き換え、^{3}H-化合物A(アマシャム社で合成)を最終濃度100nmol/Lとなるよう作用させ37℃、5%CO_2存在下で6時間培養した。培養後、細胞をPBS 5mLで1回洗って1mL/dishとなるようlysis buffer (10mmol/L Tris pH 7.5, 150mmol/L NaCl, 0.1% Nonidet P-40, 0.05% 3-((3-cholamidopropyl dimethylammonio)-1-propanesulfonate (CHAPS), 30mmol/L NaF, 1mmol/L Na_3VO_4およびprotease inhibitor cocktail (Sigma))を加えた。Lysis bufferを加えたシャーレを氷上に15分置き、細胞を可溶化させせた。遠心(12000rpm,4℃,10min)して不溶性画分を除

き上清を採取し、これをtotal cell lysateとした。

得られたtotal cell lysateを用いて定法に従い抗FLAG抗体による免疫沈降を行った。anti-FLAG M2抗体（Sigma）30μgを添加し、4℃で穏やかに振とうしながら3時間反応させ、更に50μLのprotein A Sepharose beadsを加えて4℃で穏やかに振とうしながら一晩反応させた。翌日、ビーズをlysis bufferで3回洗い、5% 2-ME含有SDS-PAGE用sample bufferを加えて100℃で10分間加熱処理した。遠心してビーズを捨てた上清を免疫沈降物とした。

免疫沈降物をSDS-PAGEにより蛋白を分離し、泳動後のゲルをブロッティング用bufferに15分間浸してSDSを除去した後、ゲルをpolyvinylidene difluoride(PVDF)膜に密着させ、ウエット式転写装置でゲル中の蛋白をPVDF膜に転写した。蛋白の転写されたPVDF膜を3%(W/V) nonfat milk含有Tris-HCl buffer（50mmol/L Tris, 138 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, pH8.0）中でブロッキングし、一次抗体（anti-FLAG M2 10μg/mL）を3% milk含有Tris-HCl buffer中で2時間反応させた。洗浄後2次抗体（HRP-anti mouse IgG）と1時間反応させた後、ECL試薬を用いてHRP標識抗体が結合した蛋白を発光させた。バンドの発光をX線フィルム Kodak Biomax-MSで撮影し、蛋白発現レベルを確認した（図2；上段パネル）。撮影の終了したPVDF膜をPBS-Tで洗って乾燥させ、イメージングプレートTR-2040に7日間感光させて、BAS-2500（富士写真フィルム）で発現蛋白に結合した^{3}H量を測定した。TLR4の747番目のシステインをアラニンに変異させた場合のみ^{3}H-化合物Aの結合量が顕著に低下した（図2；下段パネル）。化合物Aは747番目のシステインに選択的に結合していることが判明した。

[0118] 実施例3

ヒト胎児腎由来HEK293を10%FCS添加DMEM中に懸濁し、96ウェルプレートに2x10^{4}cells/wellとなるよう播種し37℃、5% CO_2存在下で一夜培養した。トランスフェクション直前に培地をOPTI-MEM（Invitrogen）50μL/wellに置換した。FLAG-TLR4 WT或いはその変異体0CA～3CA、PH、1KR～8KRをコードするプラスミドを各々0.5 ng/wellとなるように添加し、PLUS試薬（Invitrogen）及びLipofectAMINE試薬（Invitrogen）を用いて定法に従いトランスフェクションし、37℃、5%CO_2存在下で3時間培養した。培養後、20%FCS添加DMEMを100μL/wellとなるよう加え、更に一夜培養し、強制発

現細胞とした。なお、共通DNAとしてpNiFty (NF−kB活性化測定用plasmid) 15 ng/well、phRL−TK (内部標準plasmid) 15 ng/well、MD−2 plasmid 10ng/well、CD14 plasmid 10ng/wellを野生型TLR4や各変異体とともにトランスフェクションした。

トランスフェクション翌日、強制発現細胞の培地を1%FCS添加DMEMに置き換え、化合物A (エチル (6R) −6−[N−(2−クロロ−4−フルオロフェニル)スルファモイル]−1−シクロヘキセン−1−カルボキシラート)、化合物B (d−エチル 6−[N−(2,4−ジフルオロフェニル)スルファモイル]−1−シクロヘキセン−1−カルボキシラート)、化合物C (エチル 6−[N−(2−ブロモ−4−フルオロフェニル)スルファモイル]−1−シクロヘキセン−1−カルボキシラート)、化合物D (d−エチル 6−[(2−クロロ−4−フルオロベンジル)スルホニル]−1−シクロヘキセン−1−カルボキシラート) を最終濃度0、30、100、300nmol/Lとなるよう作用させ37℃、5%CO_2存在下で2時間培養した。100ng/mLとなるようLPSを添加し、更に4時間培養した。培養後、Dual−Glo™ Luciferase Assay System (Promega)を用いてルシフェラーゼの発光量を測定した。測定は、firefly luciferase (FL, NF−kB活性化由来)およびrenilla luciferase (RL ,内部標準) による発光量を測定し、FLのCPS (counts per second) 値をRLのCPSで補正した値、すなわちFL/RL ratioを求めた。結果を図3に示す。

TLR4の747番目のシステインをアラニンに変異させた場合のみ化合物A、化合物B、化合物C、化合物Dによるシグナル抑制作用が消失した。したがって、化合物A、化合物B、化合物C、化合物Dは747番目のシステインに選択的に結合し、シグナルを抑制していることがわかった。

産業上の利用可能性

[0119] 本発明のスクリーニング方法を用いることにより、TLR4の細胞内領域に結合し、TLR4のシグナル伝達を阻害する物質を選択することができ、得られた物質は心疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、中枢神経系疾患、感染性疾患、セプシス、重症セプシスまたはセプティックショックの予防・治療薬として有用である。

[0120] 本発明を好ましい態様を強調して説明してきたが、好ましい態様が変更され得ることは当業者にとって自明であろう。本発明は、本発明が本明細書に詳細に記載された以外の方法で実施され得ることを意図する。したがって、本発明は添付の「請求の範囲」の精神および範囲に包含されるすべての変更を含むものである。

本出願は、日本国で出願された特願2006−095936を基礎としており、そこに開示される内容は本明細書にすべて包含されるものである。また、ここで述べられた特許および特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

請求の範囲

[1] TLR4の細胞内領域に結合し、該分子からのシグナル伝達を阻害する物質を選択することを特徴とする、心疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、中枢神経系疾患、感染性疾患、セプシス、重症セプシスおよびセプティックショックからなる群より選択される1以上の疾患の予防・治療薬のスクリーニング方法。

[2] 当該結合部位が、配列番号:2で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号652～839で示される領域内に存在する1以上のシステイン残基である、請求項1記載のスクリーニング方法。

[3] 当該結合部位が、配列番号:2で表されるアミノ酸配列の第706番目および／または第747番目のシステイン残基である、請求項2記載のスクリーニング方法。

[4] 以下の(1)～(4)の工程を含む請求項1記載のスクリーニング方法。

(1)TLR4またはその細胞内領域を発現し、且つNF－ Bもしくは IRF3結合配列を含むプロモーターの制御下にある遺伝子を含む細胞(サンプル1)と、TLR4の細胞内領域の1以上のシステイン残基あるいはその近傍アミノ酸を他のアミノ酸に変異させた蛋白質またはその細胞内領域を発現し、且つNF－ Bもしくは IRF3結合配列を含むプロモーターの制御下にある遺伝子を含む細胞(サンプル2)とをそれぞれ調製する。

(2)試験化合物の存在下でサンプル1およびサンプル2をそれぞれ培養する。

(3)培養後、サンプル1およびサンプル2における当該遺伝子の発現を測定する。

(4)サンプル1における当該遺伝子の発現量が、サンプル2におけるそれに比べて約20%以上減少した場合に、当該試験化合物を、TLR4の細胞内領域内で該分子と結合して、該分子からのシグナル伝達を阻害する物質として選択する。

[5] 当該システイン残基が、配列番号:2で表されるアミノ酸配列の第706番目および／または第747番目のシステイン残基である、請求項4記載のスクリーニング方法。

[6] 当該遺伝子がレポーター遺伝子である、請求項4記載のスクリーニング方法。

[7] 以下の(1)～(2)の構成を含むことを特徴とする、TLR4の細胞内領域に結合して該分子からのシグナル伝達を阻害する物質を選択するためのスクリーニングキット:

(1)TLR4またはその細胞内領域を発現し、且つNF－ Bもしくは IRF3結合配列を

含むプロモーターの制御下にある遺伝子を含む細胞、

(2)TLR4の細胞内領域の1以上のシステイン残基あるいはその近傍アミノ酸を他のアミノ酸に変異させた蛋白質またはその細胞内領域を発現し、且つNF－ Bもしくは IRF3結合配列を含むプロモーターの制御下にある遺伝子を含む細胞。

[8]　TLR4の細胞内領域に結合して該分子からのシグナル伝達を阻害する物質が、心疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、中枢神経系疾患、感染性疾患、セプシス、重症セプシスおよびセプティックショックからなる群より選択される1以上の疾患の予防・治療薬である請求項7記載のスクリーニングキット。

[図1]

[図2]

WT
2CA
3CA
4CA
WT
PH
1KR
2KR
3KR
4KR
5KR
6KR
7KR
8KR
9KR
WT
1CA
3CA

[図3-1]

非刺激
LPS (100 ng/mL)
LPS+化合物A (30 nmol/L)
LPS+化合物A (100 nmol/L)
LPS+化合物A (300 nmol/L)
NF-kB (FL/RL)
120
100
80
60
40
20
0
WT
1CA
2CA
3CA
4CA
PH
WT
1KR
2KR
3KR
4KR
5KR

NF-kB (FL/RL)
120
100
80
60
40
20
0
WT
6KR
7KR
8KR
9KR
EV

[図3-2]

非刺激
LPS (100 ng/mL)
LPS+化合物B (30 nmol/L)
LPS+化合物B (100 nmol/L)
LPS+化合物B (300 nmol/L)
NF-kB (FL/RL)
0
50
100
150
200
WT
1CA
2CA
3CA
4CA
PH
NF-kB (FL/RL)
0
50
100
150
200
250
WT
1KR
2KR
3KR
4KR
5KR

NF-kB (FL/RL)
0
50
100
150
200
250
WT
6KR
7KR
8KR
9KR
EV

[図3-3]

□非刺激
□LPS (100 ng/mL)
□LPS+化合物C (30 nmol/L)
□LPS+化合物C (100 nmol/L)
■LPS+化合物C (300 nmol/L)
NF-kB (FL/RL)
200
150
100
50
0
WT
1CA
2CA
3CA
4CA
PH
NF-kB (FL/RL)
200
150
100
50
0
WT
1KR
2KR
3KR
4KR
5KR
NF-kB (FL/RL)
300
250
200
150
100
50
0
WT
6KR
7KR
8KR
9KR
EV

[図3-4]

非刺激
LPS (100 ng/mL)
LPS+化合物D (30 nmol/L)
LPS+化合物D (100 nmol/L)
LPS+化合物D (300 nmol/L)
NF-kB (FL/RL)
200
150
100
50
0
WT
1CA
2CA
3CA
4CA
PH
300
250
1KR
2KR
3KR
4KR
5KR
6KR
7KR
8KR
9KR
EV

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/056962

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/02(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50
(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q1/02, C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
UniProt/Geneseq, JMEDPlus/JST7580/JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	II M. et al. 'A novel cyclohexene derivative, ethyl (6R)-6-[N-(2-Chloro-4-fluorophenyl) sulfamoyl] cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242), selectively inhibits toll-like receptor 4-mediated cytokine production through suppression of intracellular signaling' MoI. Pharmacol. (Epub. 2005) vol. 69, pp. 1288-1295	1-8
A	JP 2004-002370 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 08 January, 2004 (08.01.04), & WO 2003/084527 Al & US 2006/0058288 Al & EP 1495756 Al	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 May, 2007 (29.05.07)	12 June, 2007 (12.06.07)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japanese Patent Office	
Facsimile No	Telephone No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AKIRA S. et al., 'Pathogen recognition and innate immunity' Cell (Feb. 2006) vol. 124, pp. 783-801	1-5
P,A	VERSTAK B. et al., 'Toll-like receptor signalling and the clinical benefits that lie within' Inflamm. Res. (2007) vol. 56, pp. 1-10	1-5

国際調査報告

国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２００７／０５６９６２

Ａ． 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl. C12Ql/02(2006. 01) i, C12N15/09 (2006. 01) i, G01N33/15 (2006. 01) i, G01N33/50 (2006. 01) i

Ｂ． 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl. C12Q1/02, C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/Geneseq, JMEDPlus/JST7580/JSTPlus(JDream2)

Ｃ． 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	II M. et al. 'A novel cyclohexene derivative, ethyl (6R)-6-[N-(2-Chloro-4-f luorophenyl) sulf amoyl] cyclohex-l-ene-l-carboxy late (TAK-242), selectively inhibits toll-like receptor 4-mediated cytokine production through suppression of intracellular signaling' MoI. Pharmacol. (Epub. 2005) vol. 69, pp. 1288-1295	1-8
A	JP 2004-002370 A (武田薬品工業株式会社) 2004.01.08 & WO 2003/084527 Al & US 2006/0058288 Al & EP 1495756 Al	1-8
A	AKIRA S. et al. 'Pathogen recognition and innate immunity' Cell (Feb. 2006) vol. 124, pp. 783-801	1-8

□ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。 □ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー

「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２９．０５．２００７	１２．０６．２００７

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員） ４Ｂ ３７７７
石丸 聡
電話番号 ０３－３５８１－１１０１ 内線 ３４４８

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
P,A	VERSTAK B. et al. 'Toll-like receptor signalling and the clinical benefits that lie within' Inflamm. Res. (2007) vol. 56, pp. 1-10	1-8